UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Desenvolvimento de filme comestível à base de alginato
incorporado do agente antimicrobiano óleo essencial de
cravo: aplicação em alimento

Maria Crystina Igarashi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Mariza Landgraf

São Paulo

2010

Maria Crystina Igarashi

Desenvolvimento de filme comestível à base de alginato
incorporado do agente antimicrobiano óleo essencial de
cravo: aplicação em alimento

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Mariza Landgraf
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
1º examinador

Profa. Dra. Cynthia Ditchfield
2º examinador

São Paulo, 30 de Agosto de 2010.

AGRADECIMENTOS

À professora Mariza Landgraf, pela orientação e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho, pela confiança e por acreditar em mim.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2008/01460-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (130359/2008-4), pela concessão de bolsas de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (2008/02856-1) recebido essencial para a execução deste trabalho.

À professora Maria Teresa Destro, pelas sugestões e pela oportunidade de aprendizado.

À professora Bernadette D. G. M. Franco, pela oportunidade de aprendizado.

À professora Cynthia J. Kunigk, da Escola de Engenharia Mauá, pelo incentivo e apoio em realizar o mestrado.

À professora Carmen Tadini, da Escola Politécnica – USP, pelas sugestões, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e por disponibilizar a utilização de equipamentos do Laboratório de Engenharia de Alimentos.

À professora Cynthia Ditchfield, da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, pelas sugestões e contribuição no trabalho.

À Ana Cristina e Otília, alunas de doutorado da POLI-USP, por toda ajuda e paciência durante os dias de análise no texturômetro.

À professora Inar Castro, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelas sugestões para a realização da análise sensorial.

Ao professor Flávio Finardi, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelo empréstimo do homogeneizador para o preparo das emulsões.

À professora Úrsula, do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pelo empréstimo de dessecadores.

À Lúcia e Rosângela, técnicas do laboratório de Bioquímica de Alimentos e

laboratório de Lípidos, pelo empréstimo de agitadores de bancada.

Ao Daniel Fernandes Zóia, da empresa Vogler, pela doação das amostras de alginato e pelo esclarecimento de dúvidas sempre que necessário.

Ao Everton Chaves, da empresa Duas Rodas, pela doação de óleos essenciais e pela cooperação à pesquisa acadêmica no reenvio de amostras sempre que solicitadas.

À Iara Sales, da empresa Dierberger, pela doação de óleos essenciais.

Ao André Dias, da empresa Apliquimica, pela doação de óleos essenciais.

Ao Rodrigo Furquini, da empresa National Starch, pela doação de amostra de amido modificado e a todo grupo de P&D da National Starch Food Innovation, o qual tenho um carinho especial desde a época de estagiária.

À Maristela, da empresa Doce Aroma, pela doação do cloreto de cálcio.

Ao Laercio Goularte, do laboratório SFDK, pela doação das cepas de Salmonella Give e Salmonella Enteritidis isoladas de carne de frango.

À Josi Conti, da Fundação André Tosello, pela doação das cepas ATCC 25416 e ATCC 27853.

Ao Anderson, pelo incentivo, sugestões e amizade sincera.

À Danielle, Graciela, Janaína e Priscila, amigas queridas que ganhei no mestrado.

Ao André e Matheus, pela amizade, ótima convivência e profissionalismo.

Aos colegas que ficam ou passaram pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Adriana, Ana Eucares, Ana Carolina, Ângela, Eb, Flávia, Haíssa, Hans, Joyce, Marildes, Maria Fernanda, Marina, Marta, Mayra, Priscila C., Rita, Svetoslav, Tatiana, Vanessa, Verena, Verônica e Vinícius.

À Lúcia e Kátia, pelo convívio agradável e ajuda no decorrer desta pesquisa.

À Mônica, Cleonice e Edílson, da secretaria do departamento de Alimentos, pelos serviços prestados.

À Elaine e Jorge, da secretaria de pós-graduação, pela atenção dedicada e serviços prestados.

Ao Márcio, que sempre me apoiou e me incentivou em minhas escolhas.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A utilização de embalagens biodegradáveis, tais como os filmes e coberturas comestíveis, apresenta-se como alternativa ao uso de recursos não-renováveis como material de embalagem. A incorporação de substâncias antimicrobianas em embalagens tem como objetivo minimizar o problema da contaminação microbiana em alimentos e, entre elas, os óleos essenciais (OE) têm recebido atenção especial por serem substâncias naturais e atenderem à preferência dos consumidores. Porém, a utilização de OE como um agente antimicrobiano natural é limitada por critérios organolépticos, sendo necessário determinar a concentração mínima necessária para inibir o desenvolvimento de microrganismos sem afetar sensorialmente as características do alimento. Assim, os objetivos desta pesquisa foram: desenvolver um filme comestível à base de alginato com incorporação de agentes antimicrobianos naturais e avaliar a adição de diferentes concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) como agente *crosslinking* na formulação do filme e na etapa complementar de formação do filme; caracterizar o filme frente às propriedades mecânicas e propriedades de barreira; determinar a concentração mínima inibitória (CIM) de óleos essenciais para *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* presentes em carne de frango, e verificar a aceitação pelo consumidor, através da análise sensorial (aroma), de pedaços de peito de frango *in natura* embalado com o filme antimicrobiano. O OE de cravo foi o que se apresentou mais eficiente para os microrganismos testados com CIM de 0,2% sendo este o limite mínimo estudado no planejamento experimental para o desenvolvimento do filme antimicrobiano. As variáveis independentes neste planejamento foram: CaCl_2 na faixa de concentração de 0,02 a 0,1% e OE cravo na faixa de 0,2 a 1,0%. Valores acima de 0,0316% de CaCl_2 , independente da concentração de OE estudada, diminuíram a zona de inibição do crescimento microbiano em testes realizados *in vitro*, possivelmente devido a formação de um gel muito forte que pode ter dificultado a incorporação da emulsão de OE na matriz polimérica dos filmes. Os resultados de permeabilidade ao vapor de água mostraram que a adição de CaCl_2 à formulação dos filmes diminuiu a permeabilidade enquanto a adição de OE cravo foi responsável pelo aumento dessa propriedade. Com relação às propriedades mecânicas, tanto a adição de CaCl_2 como a de OE cravo

à formulação dos filmes aumentou a resistência máxima à tração. Porém, com relação ao alongamento máximo na ruptura, valores menores foram obtidos com a adição de CaCl_2 , enquanto maiores valores foram encontrados com a adição de OE cravo à formulação dos filmes. A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango foi realizada somente com a formulação que apresentou os maiores valores de zona de inibição *in vitro* ($\text{CaCl}_2=0,0316\%$ e OE cravo= $0,884\%$). Após 5 dias de armazenagem a 7°C , observou-se que a utilização do filme adicionado de OE de cravo como embalagem primária em amostras de carne de peito de frango promoveu o controle da multiplicação de *L. monocytogenes* o mesmo não ocorrendo para as populações de *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp. A análise sensorial relacionada ao aroma da carne de peito de frango mostrou que o uso do filme à base de alginato incorporado de OE cravo é viável. Porém, este filme poderá sofrer interferência da matriz alimentar caso esta matriz apresente exsudação.

Palavras-chave: Filmes comestíveis. Alginato. Óleos essenciais. Microrganismos deteriorantes. Microrganismos patogênicos.

ABSTRACT

The use of biodegradable packaging such as edible films and coatings are an alternative to the use of non-recyclable packaging. The incorporation of antimicrobial substances in packaging aims at reducing food microbial contamination among which, essential oils (EO) have received special attention being natural and attending consumer demand. However, the use of EO as a natural antimicrobial agent is limited by organoleptic criteria making it necessary to determine the minimum concentration to inhibit the multiplication of microorganisms without affecting the sensory characteristics of the food. Therefore, the aims of this research were: to develop an alginate based edible film with natural antimicrobial agents, evaluating the addition of different concentrations of calcium chloride as a crosslinking agent in the formulation of the film and in the complementary stage; to characterize the mechanical properties and barrier properties; to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of EO for *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* found in chicken meat and to verify consumer acceptance of the product through sensorial analysis (aroma). Among the studied EO, the concentration of 0.2% of clove oil was effective in inhibiting the microorganisms tested, this concentration being the minimum limit used in the experimental design for film development. The independent variables studied in this design were calcium chloride in the range of 0.02 to 0.01% and clove EO in the range of 0.2 to 1.0%. Concentrations of CaCl_2 above 0.0316%, independent of the EO concentration, reduced the inhibition zone of microbial growth in *in vitro* tests, possibly due to the formation of a very strong gel which could have made the incorporation of the EO emulsion in the polymeric matrix of the film very difficult. The results of water vapor permeability tests showed that the addition of CaCl_2 to the formulation of the films reduced the permeability while the addition of clove EO increased this property. Regarding to mechanical properties, the addition of CaCl_2 as well as clove EO to the film formulation increased the values of tensile strength. On the other hand, relating to elongation at the break, smaller values were obtained with the addition of the salt while the addition of EO provided higher values. The evaluation of antimicrobial activity of the films in chicken meat was performed only with the formulation that showed the highest inhibition

values presented *in vitro* ($\text{CaCl}_2=0.0316\%$ and clove EO= 0.0884%). After five days of storage at 7°C , it was observed that the use of the film added by clove EO as primary packaging provided the control of *L. monocytogenes* growth in samples of chicken meat but not of *Salmonella* spp and *Pseudomonas* spp. The sensorial analysis – aroma – showed that the use of alginate based film incorporated with clove EO is viable in food. However, when the food matrix presents exudation, it can interfere in this film.

Key words: Edible films. Alginate. Essential oil. Spoilage microorganisms. Pathogenic microorganisms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
	FILMES E COBERTURAS ANTIMICROBIANAS	6
3	OBJETIVOS	15
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1	MATERIAL	16
4.1.1	CEPAS UTILIZADAS	16
4.1.1.1	Cepas padrão	16
4.1.2	AMOSTRAS DE ALIMENTO	16
4.1.3	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	16
4.1.4	MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO	17
4.2	MÉTODOS	17
4.2.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Pseudomonas</i> spp. EM CARNE DE FRANGO	17
4.2.1.1	Isolamento.....	17
4.2.1.2	Seleção e purificação das colônias.....	18
4.2.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	18
4.2.2.1	Preparo da emulsão.....	18
4.2.2.2	Método de diluição em ágar (Oussalah <i>et al.</i> , 2006b).....	19
4.2.3	ELABORAÇÃO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO	21
4.2.3.1	Ensaio preliminares.....	21
4.2.3.2	Filmes à base de alginato.....	22
4.2.3.3	Etapa de <i>crosslinking</i> complementar em solução de cloreto de cálcio	23
4.2.3.4	Planejamento experimental dos filmes antimicrobianos à base de alginato	23
4.2.4	ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO FILME	25
4.2.4.1	Propriedade de barreira ao vapor de água	25
4.2.4.2	Propriedades mecânicas.....	27
4.2.4.3	Atividade de água (a_w).....	29
4.2.4.4	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes.....	29
4.2.4.5	Atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango	29
4.2.4.5.1	Preparo do inóculo de <i>Salmonella</i> spp.	30
4.2.4.5.2	Preparo do inóculo de <i>Pseudomonas</i> spp.	30
4.2.4.5.3	Preparo do inóculo de <i>L. monocytogenes</i>	30
4.2.4.5.4	Atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango contra <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp.	31

4.2.4.5.5	Atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango contra <i>Pseudomonas</i> spp...	32
4.2.4.6	Análise Microbiológica.....	32
4.2.4.6.1	Preparo das amostras	32
4.2.4.6.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. (ANDREWS et al., 2001, modificado).....	33
4.2.4.6.3	Enumeração de <i>Salmonella</i> spp.....	33
4.2.4.6.4	Pesquisa de <i>L. monocytogenes</i> (HITCHINS, 2003, modificado).....	34
4.2.4.6.5	Enumeração de <i>L. monocytogenes</i>	34
4.2.4.6.6	Enumeração de <i>Pseudomonas</i> spp. (ARNAUT-ROLLIER, ZUTTER e HOOF, 1999).....	34
4.2.4.6.7	Contagem total de aeróbios psicotróficos (COUSIN, JAY e VASAVADA, 2001).....	34
4.2.4.6.8	Contagem total de aeróbios mesófilos (MORTON, 2001).....	35
4.2.4.7	Análise sensorial.....	35
4.2.4.8	Análise estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Pseudomonas</i> spp. EM CARNE DE FRANGO	37
5.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS	
	ESSENCIAIS	37
5.3	DESENVOLVIMENTO DO FILME À BASE DE ALGINATO.....	42
5.3.1	ENSAIOS PRELIMINARES	42
5.3.2	FORMULAÇÃO FINAL.....	44
5.3.3	PROPRIEDADE DE BARREIRA AO VAPOR DE ÁGUA	46
5.3.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS	51
5.3.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DOS FILMES.....	58
5.3.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM CARNE DE FRANGO	69
5.3.7	ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)	71
5.3.8	ANÁLISE SENSORIAL	72
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS	76
8	ANEXOS	84
8.1	ANEXO 1	84
8.2	ANEXO 2	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos ácidos β -1,4-D-manurônico e α -1,4-L-gulurônico (QIN, 2008)	9
Figura 2. Estrutura química dos blocos GG, MM e GM/MG (QIN,2008)	9
Figura 3. Esquema mostrando a interação dos blocos-G na presença de íons Ca^{2+} , “egg-box model”. Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do cátion (BRACCINI e PÉREZ, 2001)	10
Figura 4. Esquema ilustrativo do preparo da emulsão de óleo essencial em amido modificado, incorporação da emulsão em ágar infusão de cérebro e coração e distribuição em placas de Petri.	20
Figura 5. Esquema ilustrativo do método de diluição em ágar para a determinação da concentração inibitória mínima	20
Figura 6. Representação esquemática do processo de elaboração dos filmes	25
Figura 7. Prensa utilizada para a fixação dos filmes utilizados nos ensaios de permeabilidade ao vapor de água	26
Figura 8. Branco (esquerda) e conjunto dessecante (direita) utilizados para os ensaios de permeabilidade ao vapor de água	26
Figura 9. Amostra de peito de frango embalada com o filme antimicrobiano.....	31
Figura 10. Filme à base de alginato: (A) antes da etapa de imersão em CaCl_2 e (B) após a etapa de imersão sem a remoção do excesso de CaCl_2	43
Figura 11. Filme à base de alginato após a imersão em CaCl_2 e realização da etapa de lavagem em água destilada	44
Figura 12. Filme à base de alginato com adição de cloreto de cálcio na formulação: (A) antes da etapa de <i>crosslinking</i> complementar em solução de cloreto de cálcio e (B) após a etapa de <i>crosslinking</i> complementar em solução de cloreto de cálcio.	45
Figura 13. Filme à base de alginato com adição de cloreto de cálcio na formulação e após a realização da etapa de <i>crosslinking</i> complementar pela adição da solução de cloreto de cálcio diretamente à placa contendo o filme previamente seco	45
Figura 14. Superfície de resposta para permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^1$)	

em função da concentração de OE cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%).....	49
Figura 15. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta permeabilidade ao vapor de água	49
Figura 16. Superfície de resposta para a resistência máxima à tração (MPa) em função da concentração de OE cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%).....	54
Figura 17. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta resistência máxima à tração	54
Figura 18. Superfície de resposta para o alongamento máximo na ruptura (%) em função da concentração de OE cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%)	56
Figura 19. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta alongamento máximo na ruptura.....	57
Figura 20. Curvas de contorno relativas à zona de inibição (mm^2) contra: (A) <i>L. monocytogenes</i> , (B) <i>S. Give</i> , (C) <i>S. Enteritidis</i> e (D) <i>P. aeruginosa</i> resultante da variação da concentração de óleo essencial de cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%).....	67
Figura 21. Curvas de contorno relativas à zona de inibição (mm^2) contra: (E) <i>P. fluorescens</i> QaF01, (F) <i>P. fluorescens</i> Lb03, (G) <i>P. putida</i> Kb04 e (H) <i>P. putida</i> Ia03 resultante da variação da concentração de óleo essencial de cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%).....	68
Figura 22. Amostra de peito de frango embalada por 5 dias a 7° C com o filme antimicrobiano	71
Figura 23. Amostras de peito de frango após 5 dias de armazenamento a 7° C: (A) sem aplicação do filme antimicrobiano e (B) com aplicação do filme antimicrobiano.....	72
Figura 24. Aceitabilidade das amostras de peito de frango <i>in natura</i> com relação ao aroma.....	73
Figura 25. Avaliação da produção de pigmento fluorescente sob luz branca (A) e luz UV (B)	86
Figura 26. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>L. monocytogenes</i>	87
Figura 27. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>S. Give</i>	89

Figura 28. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>S. Enteritidis</i>	91
Figura 29. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>P. Aeruginosa</i> ATCC 27583	93
Figura 30. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>P. fluorescens</i> QaF01.....	95
Figura 31. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>P. fluorescens</i> Lb03.....	97
Figura 32. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>P. putida</i> Kb04	99
Figura 33. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>P. putida</i> Ia03	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de aplicação de filmes e coberturas à base de alginato com ação antimicrobiana em alimentos e <i>in vitro</i>	13
Tabela 2. Formulações utilizadas nos ensaios preliminares.....	22
Tabela 3. Planejamento experimental dos filmes antimicrobianos à base de alginato utilizando o delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR ²) com três pontos centrais.....	24
Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CIM) de óleos essenciais para <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> Give, <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Pseudomonas fluorescens</i> (QaF01 e Lb03), <i>P. putida</i> (Ia03 e Kb04) e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	41
Tabela 5. Valores médios da permeabilidade ao vapor de água (PVA) após etapa de <i>crosslinking</i> complementar com cloreto de cálcio dos filmes obtidos a partir dos ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental	47
Tabela 6. Coeficientes de regressão para a variável resposta permeabilidade ao vapor de água	48
Tabela 7. ANOVA para a permeabilidade ao vapor de água	48
Tabela 8. Valores da permeabilidade ao vapor de água (PVA) experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	50
Tabela 9. Valores médios da resistência máxima à tração (R _{máx}) e alongamento na ruptura (%) após etapa de <i>crosslinking</i> complementar com cloreto de cálcio dos filmes obtidos a partir dos ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental	52
Tabela 10. Coeficientes de regressão para a variável resistência máxima à tração	53
Tabela 11. ANOVA para a resistência máxima à tração	53
Tabela 12. Coeficientes de regressão para a variável alongamento máximo na ruptura	55
Tabela 13. ANOVA para a variável alongamento máximo na ruptura	55
Tabela 14. Valores da resistência máxima à tração (R _{máx}) experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	57
Tabela 15. Valores da porcentagem de alongamento na ruptura (Al %) experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	57

Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos filmes avaliada pela medida da zona de inibição em mm ² contra <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Give</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>P. fluorescens</i> QaF01, <i>P. fluorescens</i> Lb03, <i>P. putida</i> Ia03, <i>P. putida</i> Kb04 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 para as etapas antes (I) e após o <i>crosslinking</i> complementar com cloreto de cálcio (II)	60
Tabela 17. Comparação dos valores de zona de inibição (mm ²) encontrados para os diferentes microrganismos avaliados em cada ensaio considerando apenas a etapa pós- <i>crosslinking</i> complementar com cloreto de cálcio	61
Tabela 18. Modelo final para a zona de inibição (ZI) em mm ² por microrganismo avaliado em função da concentração de cloreto de cálcio e concentração de óleo essencial de cravo adicionada na formulação do filme de alginato, considerando apenas a etapa pós- <i>crosslinking</i> complementar	64
Tabela 19. Análise microbiológica dos ensaios em amostras de peito de frango	69
Tabela 20. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i>	87
Tabela 21. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>Listeria monocytogenes</i>	87
Tabela 22. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Listeria monyctogenes</i> – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo88	
Tabela 23. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>S. Give</i>	89
Tabela 24. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>S. Give</i>	89
Tabela 25. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Salmonella Give</i> – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	90
Tabela 26. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>S. Enteritidis</i>	91
Tabela 27. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>S. Enteritidis</i>	91
Tabela 28. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Salmonella Enteritidis</i> – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo ...	92
Tabela 29. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	93

Tabela 30. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	93
Tabela 32. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	94
Tabela 33. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> QaF01	95
Tabela 34. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> QaF01	95
Tabela 34. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> QaF01 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	96
Tabela 35. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> Lb03.....	97
Tabela 36. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> Lb03	97
Tabela 34. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Pseudomonas fluorescens</i> Lb03 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	98
Tabela 37. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas putida</i> Kb04	99
Tabela 38. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas putida</i> Kb04.....	99
Tabela 34. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Pseudomonas putida</i> Kb04 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	100
Tabela 39. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas putida</i> Ia03	101
Tabela 40. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra <i>Pseudomonas putida</i> Ia03	101
Tabela 34. Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm ² contra <i>Pseudomonas putida</i> Ia03 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo	102

1 INTRODUÇÃO

Durante o transporte e armazenagem, os alimentos estão expostos a inúmeras condições físicas, químicas e microbiológicas que podem causar alterações na sua qualidade e inocuidade. A estabilidade de um produto alimentício é afetada pelas alterações em componentes como proteínas, lipídios, carboidratos, conteúdo de água e também devido a outros fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos como, por exemplo, exposição à luz, umidade, temperatura, dentre outros. A escolha de uma proteção ou barreira efetiva como embalagem de um alimento pode retardar uma possível deterioração e com isso aumentar a qualidade de um produto alimentício (CHA e CHINNAN, 2004).

Os polímeros sintéticos representam cerca de 25% de todo material utilizado na indústria de embalagem. O destaque para este tipo de embalagem está relacionado com propriedades mecânicas, físicas e químicas superiores, tais como, resistência mecânica, propriedades de barreira e transparência, características estas que não são encontradas em embalagens à base de celulose. O gasto energético para a produção desse tipo de embalagem é alto quando comparado com as embalagens de celulose, aumentando assim, o custo para a comercialização de um produto alimentício. Atualmente, os materiais derivados de polímeros sintéticos representam o maior grupo de resíduos poluentes depositados no meio ambiente (JAYASEKARA *et al.*, 2005).

A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos destaca que, em muitos casos, não é possível a utilização de materiais reciclados na fabricação de novas embalagens para alimentos, uma vez que componentes químicos e aditivos remanescentes do processo de reciclagem podem migrar e afetar a inocuidade desse alimento. A dificuldade na eliminação de aditivos e coadjuvantes durante o processo de reciclagem deve-se ao fato deles serem incorporados à matriz polimérica durante a fabricação da embalagem (FDA, 2006).

De acordo com Debeaufort, Quezada-Gallo e Voilley (1998), a substituição de embalagens sintéticas por embalagens biodegradáveis, tais como os filmes e coberturas comestíveis, apresenta-se como alternativa ao uso de recursos não-

renováveis como material de embalagem.

Entre as diversas substâncias usadas em filmes e coberturas comestíveis, encontra-se o alginato que é um polissacarídeo extraído de algas marinhas pardas da classe *Phaeophyceae* (GACESA, 1988). Considerados substâncias naturais e seguras para aplicação em alimentos, os sais de alginato são amplamente utilizados na indústria de alimentos como espessante, estabilizante e na produção de filmes e coberturas (ROJAS-GRAÜ *et al.*, 2007a). Os filmes à base de alginato podem ser aplicados em alimentos com alto teor de umidade por essa substância ser capaz de reagir com íons divalentes de cálcio e formar géis fortes e insolúveis.

Considerado um substrato favorável para a multiplicação microbiana, a carne de frango está exposta às contaminações em diversas etapas do seu processamento, desde o abate dos animais até a comercialização. Em geral, os riscos maiores referem-se à contaminação cruzada na linha de processamento e sempre que as boas práticas de fabricação não são seguidas (HILTON Jr, CASON e INGRAM, 2004).

Para minimizar o problema da contaminação microbiana tem-se incorporado substâncias antimicrobianas em embalagens com o objetivo de inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos em alimentos (SEYDIM e SARIKUS, 2006).

Entre as substâncias inibidoras, as substâncias naturais têm recebido especial atenção da indústria alimentícia por causa da preferência cada vez maior dos consumidores (OUSSALAH *et al.*, 2006a).

Assim, pretendeu-se desenvolver um filme à base de alginato e estudar a incorporação de óleos essenciais – óleo essencial de cravo – à essa formulação como forma de controle do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes em pedaços de carne de frango.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é considerado o maior exportador mundial de carne de frango, sendo responsável pela produção de 3,203 milhões toneladas, o que representa cerca de 50% da produção mundial desta carne (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango, 2007).

Considerado um substrato favorável para a multiplicação microbiana, a carne de frango está exposta às contaminações em diversas etapas da sua produção, desde o abate dos animais até a comercialização. Em geral, os riscos maiores referem-se à contaminação cruzada na linha de processamento e sempre que as boas práticas de fabricação não são seguidas (HILTON Jr, CASON e INGRAM, 2004).

Os microrganismos psicrotróficos, capazes de se multiplicar em temperatura de refrigeração, apresentam-se como a microbiota predominante durante a vida-de-prateleira da carne de frango *in natura*. Entre esses microrganismos, a maioria está relacionada às bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas*, responsáveis pela deterioração de carnes. A deterioração por esses microrganismos é caracterizada pela produção de odores desagradáveis e produção de limosidade na superfície do produto (SUNDHEIM, SLETTEN e DAINITY, 1998).

De acordo com Jay (2000), em estágios avançados do processo de deterioração da carne de frango é observado o aparecimento de pigmento fluorescente na superfície do produto quando este é examinado sob luz ultravioleta. Segundo Sundheim, Sletten e Dainty (1998), os isolados relacionados à produção de fluorescência, conferida pelo pigmento fluoresceína, são *P. fluorescens* e *P. lundensis*, sendo *P. fluorescens* a espécie de maior prevalência neste tipo de deterioração.

Outros microrganismos psicrotróficos como *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* apresentam importância na área de produtos cárneos por causarem doenças transmitidas por alimentos (TSIGARIDA, SKANDAMIS e NYCHAS, 2000). Dentre os microrganismos citados, *L. monocytogenes*, bactéria Gram-positiva, destaca-se, também, pela capacidade de formação de biofilmes e

estabelecimento em plantas processadoras de alimentos através da colonização de equipamentos, drenos de pisos, etc, permanecendo como microbiota residente por meses ou até anos (ZHAO, DOYLE e ZHAO, 2004; CHIARINI, 2007; DIAS, 2008). Entre os microrganismos Gram negativos, *Salmonella* é de grande importância em carne de frango e derivados por estarem, frequentemente, envolvidos em surtos de gastroenterite por alimentos (HERISKTAD, MOTARJEMI e TAUXE, 2002; HUMPHREY, 2004).

Na tentativa de minimizar o problema da contaminação de alimentos, diversas substâncias antimicrobianas são permitidas pela legislação dos países. Os óleos essenciais (OE), presentes em condimentos e plantas, além de preencherem esse requisito, são naturais, o que torna o seu uso extremamente atraente e por, atualmente, terem preferência atual do consumidor por esse tipo de substância. Esses óleos apresentam maior efeito inibitório na forma "in natura", isto é, quando em condimentos ou plantas (Jay, 2000). A atividade antimicrobiana de OE é assegurada pela presença de compostos fenólicos e terpenos (OUSSALAH *et al.*, 2007b).

Os OE são resultantes dos produtos voláteis extraídos por destilação e estão concentrados em regiões específicas como folha, semente, casca ou fruto. Quando encontrados em diferentes regiões de uma mesma planta apresentam perfis de composição diversificados (CONNER e BEUCHAT, 1984 *apud* OUSSALAH *et al.*, 2007a).

Óleos essenciais extraídos de um mesmo gênero de planta podem apresentar diferenças relacionadas ao seu potencial antimicrobiano. As razões para essa variabilidade estão relacionadas ao local geográfico do cultivo, clima e estação do ano da colheita, genótipo da planta e diferenças no processo de extração do óleo. Esses fatores influenciam na composição e na concentração de cada constituinte extraído (BURT e REINDERS, 2003).

Até 2004, pouco se sabia sobre o modo de ação dos OE (Burt, 2004). Para Sikkema, de Bont e Poolman (1994), a interação entre as substâncias hidrofóbicas presentes em OE e os compostos lipídicos da membrana celular poderia propiciar uma alteração em sua estrutura e alterar sua permeabilidade causando o efluxo de íons e/ou saída de metabólitos celulares. Pesquisas mais

recentes realizadas por Devi *et al.* (2010) e Gill e Holley (2006) confirmam essas observações, ou seja, que eles agem na membrana celular alterando a sua permeabilidade e até mesmo rompendo-a.

Grande parte dos trabalhos que avaliaram o modo de ação de OE contra microrganismos patogênicos e deteriorantes verificaram que, em geral, as bactérias Gram-positivas apresentam-se mais sensíveis quando comparadas às bactérias Gram-negativas (OUATTARA *et al.*, 1997; SMITH-PALMER, STEWART e FYFE, 1998; JULIANO, MATTANA e USAI, 2000; MARINO, BERSANI e COMI, 2001; HARPAZ *et al.*, 2003). A menor susceptibilidade dos microrganismos Gram-negativos aos OE está relacionada com a presença de uma membrana externa formada por uma dupla camada lipídica que dificulta a difusão dos compostos presentes no óleo essencial (BURT, 2004).

No entanto, alguns estudos discordam dos anteriores. Em estudo desenvolvido por Tassou, Drosinos e Nychas (1995), a utilização de óleo essencial de menta aplicado em formulação de um alimento grego típico (tzatziki) foi tão efetiva para a redução da população de *S. Enteritidis* quanto para *L. monocytogenes*. Oussalah *et al.* (2007a) verificaram que para os OE de canela chinesa, cravo, orégano grego e tomilho, *S. Typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7, que são bactérias Gram-negativas, requereram uma menor concentração de OE para sua completa inibição comparada com *L. monocytogenes*.

Segundo Seydim e Sarikus (2006), os OE que possuem propriedades antimicrobianas para microrganismos patogênicos contêm elevadas concentrações de compostos fenólicos como o carvacrol, eugenol e timol. Além desses compostos, a presença de compostos ativos como o p-cimeno, aldeído cinâmico, terpineno, limoneno, alicina, dentre outros, são responsáveis pela ação antimicrobiana desses óleos (CEYLAN e FUNG, 2004).

Considerado seguro para o consumo humano (GRAS – Generally Recognized as Safe), o uso de OE é limitado por critérios organolépticos. Por esta razão, é necessário determinar a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de microrganismos sem afetar sensorialmente as características do alimento (OUSSALAH *et al.*, 2007a).

FILMES E COBERTURAS ANTIMICROBIANAS

As embalagens com ação antimicrobiana, consideradas como uma parte da área de embalagens ativas, vêm sendo estudadas com o objetivo de reduzir o risco do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e aumentar a vida-de-prateleira de produtos alimentícios (SUPPAKUL *et al.*, 2003). A incorporação de agentes antimicrobianos naturais em filmes comestíveis é considerada uma alternativa ao uso de recursos não-renováveis como material de embalagem (CHA e CHINAN, 2004).

Além de filmes comestíveis, as substâncias antimicrobianas também podem ser incorporadas em coberturas comestíveis ou *coatings*. Segundo Debeaufort, Quezada-Gallo e Voilley (1998), essas coberturas são definidas como finas camadas de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que filmes são materiais aplicados ao produto após serem formados separadamente.

Inúmeras matrizes vêm sendo utilizadas e a composição dos filmes apresenta propriedades específicas que variam com o tipo de base utilizada podendo ser divididos em três categorias segundo sua composição: polissacarídeos e seus derivados, protéicos e lipídicos. Dentre os polissacarídeos mais utilizados estão: amidos, alginatos, pectinas, carragenas, ágar e derivados de celulose; os protéicos incluem: glúten, proteína isolada de soja, gelatina, albumina de ovo e zeína e os lipídicos que incluem as ceras, ácidos graxos, dentre outros. A escolha da composição do filme depende do tipo de aplicação desejado (BRAVIN, PERESSINI e SENSIDONI, 2006; CHA e CHINNAN, 2004).

Os polissacarídeos e proteínas utilizados para o preparo de filmes apresentam boa barreira ao CO₂ e O₂, porém, não são considerados boa barreira ao vapor de água. Os filmes protéicos, em geral, apresentam menor extensibilidade quando comparado aos filmes que utilizam polissacarídeos em sua composição (CHA e CHINNAN, 2004).

Os filmes à base de polissacarídeos e proteínas tendem a intumescer e dissolver quando aplicados em alimentos com alta atividade de água. Dessa forma, torna-se necessária a adição de aditivos ou agentes de *crosslinking* para

diminuir a solubilidade desses filmes. Segundo Seydim e Sarikus (2006), a propriedade de barreira à umidade em filmes pode ser melhorada com a incorporação de componentes hidrofóbicos como os lipídios.

Os filmes lipídicos apresentam barreira eficiente à umidade, mas, baixa resistência mecânica, baixa aderência, quebra na superfície do filme, dificuldade de homogeneidade e sabor residual. Desse modo, para se obter a característica desejada é utilizada a combinação de materiais para a formação de filmes (CHA e CHINNAN, 2004).

As propriedades do filme comestível são influenciadas por parâmetros como formulação ou composição do alimento, tecnologia de formação do filme, características do solvente e uso de aditivos (BRAVIN, PERESSINI e SENSIDONI, 2006).

Para a produção de filmes em escala laboratorial, utiliza-se a técnica tipo *casting*, na qual a solução filmogênica é porcionada sobre suportes, levada para secagem e destacada. Em escala industrial, algumas técnicas já utilizadas para a fabricação de filmes plásticos vêm sendo utilizadas para a produção de filmes comestíveis e biodegradáveis, tais como: técnicas de extrusão, coextrusão para filmes multicamadas e processo de secagem para a remoção do solvente da solução polimérica (DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY, 1998).

Inúmeras matrizes vêm sendo utilizadas como veículo para incorporação de agentes antimicrobianos naturais no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos: filmes à base de proteína de soja incorporados de nisina, substância antimicrobiana natural produzida por *Lactococcus lactis*, extrato de chá verde e extrato de semente de uva utilizados para o controle de *L. monocytogenes* (THEIVENDRAN, HETTIARACHCHY e JOHNSON, 2006); filmes compostos por proteína isolada de soro de leite contendo OE de orégano e alho aplicados em salsichas e em queijos processados fatiados, para o controle de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. Enteridis*, *L. monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum* (SEYDIM e SARIKUS, 2006); filmes à base de quitosana e hidroxipropil-metil-celulose (HPMC) incorporados de nisina utilizados no controle de *Aspergillus niger* e *Kocuria rhizophila* (SEBTI *et al.*, 2007); filmes à base de quitosana utilizados no controle de *L. monocytogenes* em rosbife pronto para o

consumo (BEVERLYA *et al.*, 2008); filmes à base de purê de maçã incorporados de carvacrol e utilizados para o controle de *E. coli* O157:H7 (DU *et al.*, 2008), dentre outros.

Além de serem utilizados como coadjuvantes para a incorporação de substâncias antimicrobianas, filmes e coberturas comestíveis podem atuar na encapsulação e no transporte de substâncias como aromas, temperos, agentes antioxidantes e outros aditivos alimentares (DEBEAUFORT, QUEZADA-GALLO e VOILLEY, 1998).

Entre os polissacarídeos, o alginato apresenta potencial aplicação em diversas áreas tais como indústrias de alimentos e farmacêutica, na odontologia, e na área ambiental, por ser capaz de formar géis na presença de cátions e aumentando em consequência a viscosidade de soluções (GACESA, 1988). Outras propriedades do alginato importantes para a referida indústria são: capacidade de estabilização de suspensões e emulsões, formar de gel, formar filmes e coberturas, dentre outras (GACESA, 1988, ROJAS-GRAÜ *et al.*, 2007a; MAIZURA *et al.*, 2007).

O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marinhas pardas da classe *Phaeophyceae* (GACESA, 1988). A extração se dá através de tratamento com solução alcalina, em geral hidróxido de sódio, no qual o alginato é convertido a alginato de sódio (QIN, 2008).

A estrutura química apresenta-se na forma de um ácido polimérico linear composto de resíduos dos ácidos β -1,4-D-manurônico (M) e α -1,4-L-gulurônico (G). Como observado na Figura 2, esses ácidos apresentam conformações espaciais diferentes devido ao resíduo presente no C-5. Dessa forma, a orientação das ligações glicosídicas faz com que as regiões de β -D-manuranato apresentem cadeia linear, análoga à cadeia de celulose, enquanto que regiões de α -L-guluronato apresentam estrutura de cadeia não-linear (ERTESVAG e VALLA, 1998; GACESA, 1988).

Figura 1. Estrutura química dos ácidos β -1,4-D-manurônico e α -1,4-L-gulurônico (QIN, 2008)

Devido à estrutura polimérica, o alginato pode ser considerado um copolímero formado por blocos de β -1,4-D-manurônico (M) e α -1,4-L-gulurônico (G). Esta cadeia polimérica é formada por três tipos de blocos: os blocos GG, que contém apenas unidades derivadas do ácido α -L-gulurônico; os blocos MM, derivados do ácido β -D-manurônico e os blocos MG que consistem de unidades alternadas de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico. A Figura 2 apresenta a estrutura química dos blocos GG, MM, GM/MG (ERTESVAG e VALLA, 1998; GACESA, 1988; SIEW e WILLIAMS, 2005).

Figura 2. Estrutura química dos blocos GG, MM e GM/MG (QIN,2008)

A razão entre as unidades M:G e a quantidade relativa dos três segmentos poliméricos varia com a fonte de obtenção. Assim, os alginatos extraídos de algas marinhas distintas apresentam composição e estrutura polimérica diferentes e, conseqüentemente, apresentam propriedades diferentes. Uma

diferença importante é observada na característica dos géis. Os alginatos com maior porcentagem de blocos-G formam géis mais rígidos, porém quebradiços. Já os géis de alginato com maior porcentagem de blocos-M são menos rígidos e apresentam maior flexibilidade (GACESA, 1988; ERTESVAG e VALLA, 1998).

A variação na força do gel está relacionada com a ligação dos cátions com os diversos blocos estruturais presentes na molécula de alginato. Todos os blocos são polianiónicos e formam ligações iônicas intermoleculares na presença de cátions di ou multivalentes, como o Ca^{2+} , por exemplo. Entretanto, as regiões onde há predomínio de blocos-G são as que quelam os íons metálicos mais facilmente devido ao arranjo espacial da molécula o que torna esse tipo de interação mais forte (GACESA, 1988). Segmentos de cadeia consistindo de resíduos de ácido manurônico e gulurônico alternados não interagem com o cálcio, mas servem para ligar as estruturas agregadas, produzindo uma rede tridimensional (CI *et al.*, 1999). O modelo que explica a interação das cadeias de alginato é o modelo caixa de ovo (do inglês "egg-box model"), apresentado na Figura 3, onde os íons Ca^{2+} representam os ovos, dispostos entre os espaços existentes no bloco-G, que fazem o papel de caixa. Esta interação é responsável por uma das principais propriedades dos alginatos: formação de géis (GRANT *et al.*, 1973; GACESA, 1988; BRACCINI e PÉREZ, 2001).

Figura 3. Esquema mostrando a interação dos blocos-G na presença de íons Ca^{2+} , "egg-box model". Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do cátion (BRACCINI e PÉREZ, 2001)

Os íons de cálcio são considerados os mais efetivos no processo de gelificação dos filmes à base de alginato, quando comparados com íons de magnésio, manganês, alumínio e ferro (CHA e CHINAN, 2004). Pavlath *et al.* (1999) demonstraram que o tratamento por imersão em solução de cloreto de cálcio e cloreto de zinco foram os mais efetivos na formação de um filme insolúvel e de maior resistência mecânica quando comparado com os tratamentos utilizando íons de ferro, cobre, magnésio e alumínio.

De acordo com Kester e Fennema (1986), o processo de gelificação do alginato de sódio com cálcio pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira envolve a liberação controlada de íons bivalentes de cálcio em uma solução de alginato. A partir da interação do cálcio ionizado com os polímeros de ácido algínico, tem-se a formação de um gel homogêneo. A liberação de íons bivalentes de cálcio pode ser controlada pela alteração do pH e temperatura do meio. A segunda forma envolve a difusão de íons de cálcio para o interior da solução de alginato, no qual o processo de gelificação é alcançado quando os íons de cálcio difundem-se através da interface gel-membrana.

Em geral, trabalhos envolvendo a formação de coberturas à base de alginato envolvem, em sua maioria, o segundo método de gelificação com cálcio, seja pelo processo de imersão do alimento em solução de cálcio bivalente ou pela pulverização da solução de cálcio sobre a camada de alginato previamente formada no alimento (OLIVAS, MATTINSON e BARBOSA-CÁNOVAS, 2007; ROJAS GRAÜ *et al.*, 2007b; OMS-OLIU, SOLIVA-FORTUNYA e MARTÍN-BELLOSO, 2008; RAYBAUDI-MASSILIA, MOSQUEDA-MELGAR, MARTIN-BELLOSO, 2008; RAYUBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2008; TAPIA *et al.*, 2008; FAN *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2009). Já a formação de filmes pode envolver tanto a incorporação dos íons bivalentes na forma de solução diretamente na formulação dos filmes e posterior etapa de *crosslinking* complementar em solução de cloreto de cálcio (RHIM, 2004; ZACTITI e KIECKBUSCH, 2006; SILVA, BIERHALZ e KIECKBUSCH, 2009), ou então somente a etapa de *crosslinking* complementar (PRANOTO, SALOKHE e RAKSHIT, 2005; OUSSALAH *et al.*, 2006a; MILLETTE *et al.*, 2007; OUSSALAH *et al.*, 2007b).

Cha *et al.* (2002) e Maizura *et al.* (2007) trabalharam com filmes compostos à base de alginato e κ -carragena, e alginato e amido de sagu,

respectivamente. Ambos os trabalhos não envolveram técnica de reticulação e somente avaliaram as propriedades antimicrobianas e mecânicas do filme. Sabendo-se que tanto o alginato como a κ -carragena em solução interagem com íons cálcio, a etapa de reticulação seria interessante para a formação de um gel entre essas duas estruturas e conseqüente aumento nas propriedades de barreira e propriedades mecânicas desses filmes.

Tabela 1 apresenta estudos encontrados na literatura consultada entre o período de 2002 a 2009, relacionados à aplicação de filmes e coberturas antimicrobianas à base de alginato em alimentos e *in vitro*. Como destacado anteriormente, o processo de obtenção desses filmes e coberturas é variável quanto à etapa de reticulação com Ca^{2+} .

Tabela 1. Exemplos de aplicação de filmes e coberturas à base de alginato com ação antimicrobiana em alimentos e *in vitro*

Aplicação	Material	Método de reticulação com Ca ²⁺	Produto	Antimicrobiano	Objetivo	Referência
cobertura	Alginato	Pulverização	Pescado (<i>Channa argus</i>)	Nisina + EDTA	Controle de bactérias mesófilas e psicotróficas	LU <i>et al.</i> , 2009
cobertura	Alginato	Adição na formulação do filme	Salmão defumado	Lisozima de ostra + nisina	Controle de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Anatum</i>	DATTA <i>et al.</i> , 2008
cobertura	Alginato	Imersão	Melão (<i>Cucumis melo</i>) em pedaços	Ácido málico e óleo essencial (OE) canela, palmarosa e capim-limão	Controle de <i>S. Enteritidis</i> inoculada no produto	RAYUBAUDI-MASSILIA, MOSQUEDA-MELGAR, MARTIN-BELLOSO, 2008
cobertura	Alginato + purê de maçã	Imersão	Maçã “Fuji” em pedaços	OE orégano, capim-limão e vanilina	Controle de <i>L. innocua</i> inoculada no produto e enumeração de bolores e leveduras	ROJAS GRAÜ <i>et al.</i> , 2007b
cobertura	Alginato	Imersão	Maçã “Fuji” em pedaços	OE canela, cravo, capim-limão e respectivos compostos ativos, aldeído cinâmico, eugenol e citral	Controle de <i>E. coli</i> O157:H7 inoculada no produto	RAYUBAUDI-MASSILIA <i>et al.</i> , 2008
cobertura	Alginato e amido de pêra (comparação)	Adição na formulação do filme	Pele de frango	Fosfato tri-sódico	Controle de <i>Salmonella</i> spp. inoculada no produto	MEHYAR <i>et al.</i> , 2007
cobertura	Alginato contendo diferentes lípides	Imersão	Maçã “Gala” minimamente processada	Sorbato de potássio	Controle de mos aeróbios mesófilos, psicotróficos, bolores e leveduras	OLIVAS, MATTINSON e BARBOSA-CÁNOVAS, 2007

Continuação da Tabela 1.

Aplicação	Material	Método de reticulação com Ca^{2+}	Produto	Antimicrobiano	Objetivo	Referência
filme	Alginato de sódio + κ -carragena	(não utilizado)	(não utilizado)	EDTA + extrato grapefruit + nisina + lisozima	Avaliação da zona de inibição para <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Micrococcus luteus</i>	CHA <i>et al.</i> , 2002
filme	Alginato + amido de sago	(não utilizado)	(não utilizado)	OE capim-limão	Avaliação da zona de inibição para <i>E. coli</i> O157:H7	MAIZURA <i>et al.</i> , 2007
filme	Alginato + policaprolactona + proteína isolada de soja	Imersão	carne bovina e carne moída <i>in natura</i>	Nisina	Controle de <i>S. aureus</i> inoculado no produto	MILLETTE <i>et al.</i> , 2007
filme	Alginato	Imersão	carne bovina <i>in natura</i>	OE orégano, canela e sálvia	Controle de <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>S. Typhimurium</i> inoculada no produto	OUSSALAH <i>et al.</i> , 2006a
filme	Alginato	Imersão	Mortadela e presunto	OE orégano, canela e sálvia	Controle de <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. Typhimurium</i> inoculada no produto	OUSSALAH <i>et al.</i> , 2007b
filme	Alginato	Imersão	(não utilizado)	OE alho	Avaliação da zona de inibição para <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. cereus</i>	PRANOTO, SALOKHE e RAKSHIT, 2005

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar o potencial de utilização de filme comestível à base de alginato incorporado de agentes antimicrobianos naturais na cobertura de pedaços de frango visando o controle da população microbiana desse alimento.

Objetivos específicos:

- Desenvolver um filme comestível à base de alginato com incorporação de agentes antimicrobianos naturais e avaliar a adição de diferentes concentrações de cloreto de cálcio como agente *crosslinking* na formulação do filme e em etapa complementar;

- Caracterizar o filme frente às propriedades mecânicas e propriedades de barreira;

- Determinar a concentração mínima de óleos essenciais capaz de inibir *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* presentes em carne de frango;

- Verificar a aceitação do produto pelo consumidor através da análise sensorial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 CEPAS UTILIZADAS

4.1.1.1 Cepas padrão

As cepas utilizadas na etapa de isolamento de *Pseudomonas* spp: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 como controles positivos (doadas pela Fundação André Tosello) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle negativo, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos OE foram empregadas oito cepas assim distribuídas: duas cepas de *Pseudomonas fluorescens* e duas cepas de *Pseudomonas putida* isoladas de carne de frango, uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, uma cepa de *Salmonella* Give e uma cepa de *Salmonella* Enteritidis, ambas isoladas de carne de frango e doadas pelo Laboratório SFDK e uma cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de carne de frango e proveniente da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP.

4.1.2 AMOSTRAS DE ALIMENTO

Foram adquiridas 24 amostras de coxinha da asa (Drumett) obtidas de casas de carnes, açougues e supermercados da cidade de São Paulo/SP. As amostras foram mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais avaliados e respectivos fornecedores foram: óleo essencial de alho (Fuchs Gewürze, Itupeva, SP, Brasil), óleo essencial de cebola (Fuchs Gewürze), óleo essencial de cravo (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, SC,

Brasil), óleo essencial de gengibre africano (Apliquímica, São Paulo, SP, Brasil), óleo essencial de gengibre chinês (Apliquímica), óleo essencial de hortelã (Duas Rodas), óleo essencial de limão siciliano (Dierberger, Barra Bonita, SP, Brasil), óleo essencial de limão siciliano 5X (Dierberger), óleo essencial de laranja (Apliquímica), óleo essencial de laranja (Duas Rodas), óleo essencial de laranja 5X (Dierberger), óleo essencial natural de laranja doce (Duas Rodas) e óleo essencial de pimenta preta (Fuchs Gewürze). Com exceção das amostras provenientes da empresa Fuchs Gewürze do Brasil Ltda, todas as outras foram doadas pelos respectivos fornecedores.

4.1.4 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO

As matérias-primas utilizadas para a elaboração dos filmes foram alginato de sódio (I-3F-80, Vogler, São Paulo, SP, Brasil), glicerina bi-destilada (Mix, São Paulo, SP, Brasil) e cloreto de cálcio (solução a 20%, Doce Aroma, São Paulo, SP, Brasil). Todas as matérias-primas utilizadas para a etapa de desenvolvimento dos filmes à base de alginato são de grau alimentício.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. EM CARNE DE FRANGO

As etapas de isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp. em carne de frango foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Arnaut-Rollier, Zutter e Hoof (1999), com modificações.

4.2.1.1 Isolamento

Cada amostra analítica, composta por 25 g de pele de frango pesada assepticamente, foi adicionada a 225 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizada em *stomacher* por 2 min. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais empregando-se 1 mL do homogeneizado e 9 mL de água peptonada 0,1%. Porções de 0,1 mL foram semeadas, com auxílio de alça de Drigalski, em superfície de ágar base para *Pseudomonas* com suplemento

seletivo ceftrimide, fucidina e cefaloridina (PAB-CFC, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). As placas foram incubadas por 24 e 48 h a 25° C para observação do desenvolvimento de colônias características sob luz branca e luz ultra-violeta.

4.2.1.2 Seleção e purificação das colônias

Para confirmação do gênero *Pseudomonas* foram selecionadas de 3 a 5 colônias consideradas típicas ou suspeitas no meio PAB-CFC, ou seja, colônias de cor branca, convexas e com bordas lisas. Cada uma das colônias selecionadas foi semeada por esgotamento em placas de ágar nutriente para purificação e obtenção de colônias isoladas e incubadas a 25° C por 48 h e a 42° C por um período mínimo de 48 h e máximo de 7 dias para os isolados suspeitos de *P. aeruginosa*. As culturas puras foram utilizadas para o exame de morfologia por coloração de Gram e realização dos seguintes testes bioquímicos: produção de oxidase, produção de catalase, utilização da glicose por metabolismo fermentativo ou oxidativo (prova de O/F) e produção de pigmento fluorescente.

Os procedimentos para a realização dos testes bioquímicos encontram-se no ANEXO 1.

A identificação completa dos isolados foi realizada pelo sistema de identificação de bacilos Gram negativos não enterobactérias e não fastidiosos API® 20 NE (bioMérieux, França).

4.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

4.2.2.1 Preparo da emulsão

O preparo da emulsão de OE em amido modificado foi baseado em metodologia descrita por Oussalah *et al.* (2006b). Cada OE avaliado foi homogeneizado em homogeneizador de bancada (Ultra Turrax, mod. TP18/1059, Janke & Kunkel, Alemanha) a 20000 rpm por 2 min com uma solução estéril de amido modificado 10% (Purity gum Be, National Starch Food Innovation, EUA) de maneira a obter uma concentração final de 10% de OE. O preparo da emulsão foi realizado de forma asséptica em capela de fluxo laminar.

4.2.2.2 Método de diluição em ágar (Oussalah *et al.*, 2006b)

A partir da emulsão de OE preparada conforme 4.2.2.1, foram preparadas três concentrações do OE, sendo uma menor de 0,003%, uma média de 0,05% e uma maior de 0,8% (p/v) em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) previamente preparado e mantido a 45° C. Para cada concentração, foi preparado um frasco de ágar BHI.

A homogeneização da emulsão em ágar BHI foi realizada com o auxílio de um agitador magnético (Fisatom, mod. 753, Brasil). Posteriormente, aproximadamente 15 mL de meio de cultura foram distribuídos em placas de Petri e após sua solidificação, 40 µL da cultura dos microrganismos nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 UFC/mL foram semeadas na superfície das placas, a fim de se obter placas contendo os microrganismos nas concentrações de 10^2 , 10^3 e 10^4 UFC/mL, respectivamente. Como controle positivo, foi utilizado ágar BHI sem óleo essencial com a cultura diluída e como controle negativo, ágar BHI com óleo essencial e sem a adição do inóculo. As placas foram incubadas a 25° C por 48 h para *P. fluorescens* e *P. putida* e a 37° C por 24 h para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* ATCC 27853. A ausência de multiplicação para todas as concentrações de microrganismos avaliadas após o período de incubação foi denominada CIM.

A partir dos resultados obtidos, foram avaliadas as concentrações de 0,006%; 0,013%; 0,05%; 0,1%; 0,2% e 0,4% para a determinação da CIM.

Figura 4. Esquema ilustrativo do preparo da emulsão de óleo essencial em amido modificado, incorporação da emulsão em ágar infusão de cérebro e coração e distribuição em placas de Petri.

Figura 5. Esquema ilustrativo do método de diluição em ágar para a determinação da concentração inibitória mínima

4.2.3 ELABORAÇÃO DOS FILMES À BASE DE ALGINATO

4.2.3.1 Ensaios preliminares

A partir de contato com fornecedores, fabricantes de ingredientes alimentícios e testes iniciais realizados em laboratório foram definidas a utilização das seguintes matérias-primas de grau alimentício: alginato de sódio (I-3F-80, Vogler), glicerina bi-destilada (Mix) e cloreto de cálcio (solução a 20%, Doce Aroma).

Os filmes à base de alginato foram obtidos segundo a técnica tipo *casting*, que consiste na preparação de uma solução filmogênica e aplicação da mesma em um suporte. Nos ensaios preliminares de desenvolvimento do filme foram estudadas 4 concentrações de alginato de sódio: 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,0% e 2 concentrações de cloreto de cálcio: 2% e 20% como *crosslinking* complementar, conforme estudo proposto por Oussalah *et al.* (2006a). A concentração de glicerina bi-destilada foi fixada em 2,0% e o restante da formulação foi completado com água destilada para se obter um valor final de 100%.

Para estes ensaios foi seguida metodologia proposta por Oussalah *et al.* (2006a) onde o alginato de sódio foi solubilizado em água destilada à temperatura ambiente sob agitação a 1000 rpm (Fisatom, mod. 713, Brasil) por aproximadamente 1 hora. Em seguida, ainda sob agitação, adicionou-se a glicerina bi-destilada até sua completa solubilização na solução filmogênica. Esta solução foi mantida em descanso por aproximadamente 2 horas para a eliminação de bolhas de ar que podem interferir na resistência mecânica do filme. Posteriormente, foi realizado o porcionamento através da pesagem da solução filmogênica em placas de Petri (140 x 15 mm) a fim de se obter filmes com espessura de aproximadamente 100 µm. Após a distribuição manual da solução pela placa de Petri, as amostras foram levadas à estufa (Fanem, mod. 00203, São Paulo, Brasil) de 40° C, sem circulação forçada de ar, para a secagem. O tempo de secagem variou de 20 h a 26 h, onde o tempo final foi estabelecido quando foi observado o descolamento do filme pela borda da placa.

Tabela 2. Formulações utilizadas nos ensaios preliminares

Ingrediente	Formulações (%)			
	F1	F2	F3	F4
Alginato de sódio	3,0	2,5	2,0	1,5
Glicerina bi-destilada	2,0	2,0	2,0	2,0
Água destilada	95,0	95,5	96,0	96,5
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

Para a realização da etapa de *crosslinking* em solução de cloreto de cálcio, os filmes já secos foram acondicionados em dessecadores com umidade relativa controlada de 75% por um período mínimo de 2 h antes de serem removidos da placa de Petri e mergulhados em solução de cloreto de cálcio a 2 ou 20%. Após 5 min de imersão, os filmes foram levados para secagem em estufa a 40° C por até 1 hora.

Após a etapa de imersão por 5 min em solução de cloreto de cálcio, realizou-se uma etapa de remoção do excesso de cloreto de cálcio por lavagem com água destilada com base no estudo desenvolvido por Zactiti e Kieckbusch (2006).

4.2.3.2 Filmes à base de alginato

O processo final de elaboração dos filmes foi baseado nos resultados obtidos a partir dos ensaios preliminares e na metodologia descrita por Rhim (2004) e Zactiti e Kieckbusch (2006), com modificações. Inicialmente, solubilizou-se a glicerina bi-destilada (2%) em água destilada sob agitação a 1000 rpm por 5 min e, em seguida, adicionou-se o alginato de sódio (3%) mantendo a agitação a 1000 rpm por 20 min. A solução filmogênica obtida foi mantida em descanso por aproximadamente 2 horas. Posteriormente, foi realizado o porcionamento através da pesagem da solução filmogênica em placas de Petri (140 x 15 mm). Após a distribuição manual da solução pela placa de Petri, as amostras foram levadas à estufa de 40° C por 20 h para secagem. Após o término da secagem, as amostras foram mantidas em dessecador com umidade relativa de 75%. Os filmes apresentaram espessura final de aproximadamente 100 µm.

4.2.3.3 Etapa de *crosslinking* complementar em solução de cloreto de cálcio

Para a etapa de *crosslinking* complementar dos filmes em solução de cloreto de cálcio, foram adicionados 50 mL de solução de cloreto de cálcio a 2% às placas contendo os filmes já secos em estufa. Após 5 min de contato, a solução de cloreto de cálcio foi removida da placa e o excesso foi retirado por lavagem com água destilada. Os filmes foram levados para secagem em estufa a 40° C por até 1 hora.

4.2.3.4 Planejamento experimental dos filmes antimicrobianos à base de alginato

Após a determinação da formulação base para o desenvolvimento do filme à base de alginato, foi avaliada a influência do grau de reticulação com cloreto de cálcio adicionado à formulação do filme como forma de manutenção do agente antimicrobiano. Para isso, adotou-se o Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 (DCCR 2^2) com três pontos centrais, sendo +1: máxima concentração, -1: mínima concentração, 0: ponto central, +1,41: $+\alpha$ e -1,41: $-\alpha$. As variáveis estudadas foram: (a) concentração de cloreto de cálcio utilizada na formulação do filme como forma de *crosslinking*, sendo o limite mínimo (-1,41=0,02%) estabelecido a partir de estudo relatado em literatura (SILVA, BIERHALZ e KIECKBUSCH, 2009) e o limite máximo (+1,41=0,1%) determinado pela máxima concentração adicionada que não provocasse uma gelificação localizada e (b) concentração de óleo essencial de cravo, sendo o limite mínimo (-1,41=0,2%) o valor determinado pela determinação da concentração inibitória mínima e o limite máximo (+1,41=1,0%) estabelecido a partir de estudos preliminares avaliando a incorporação do agente ativo na formulação do filme e seu potencial frente aos microrganismos alvos.

Tabela 3. Planejamento experimental dos filmes antimicrobianos à base de alginato utilizando o delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR²) com três pontos centrais

Ensaio	Valores codificados		Valores originais (%)	
	CaCl ₂	OE cravo	CaCl ₂	OE cravo
1	-1	-1	0,0316	0,316
2	+1	-1	0,0884	0,316
3	-1	+1	0,0316	0,884
4	+1	+1	0,0884	0,884
5	-1,41	0	0,02	0,60
6	+1,41	0	0,10	0,60
7	0	-1,41	0,06	0,20
8	0	+1,41	0,06	1,00
9	0	0	0,06	0,60
10	0	0	0,06	0,60
11	0	0	0,06	0,60

Os ensaios foram realizados seguindo as etapas descritas no item 4.2.3.2, sendo que o óleo essencial foi incorporado na formulação após a adição da glicerina bi-destilada. A etapa de *crosslinking* complementar com solução de CaCl₂ foi realizada após a incorporação do alginato de sódio e realizada de maneira controlada sob agitação de 2000 rpm a fim de evitar a ocorrência de gelificação localizada e formação de grumos na suspensão final. A Figura 6 apresenta, esquematicamente, o processo de elaboração dos filmes para o planejamento experimental DCCR².

Figura 6. Representação esquemática do processo de elaboração dos filmes

4.2.4 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DO FILME

4.2.4.1 Propriedade de barreira ao vapor de água

A determinação das propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a American Society for Testing and Materials – ASTM E96-00, 2000. O método gravimétrico consiste na avaliação do ganho de massa do conjunto dessecante composto pela sílica (ativada a 105° C por 24 h, UR=0%), filme e placa de alumínio. Para a análise foi utilizado um kit para permeabilidade (Regmed, Brasil) composto de placas de alumínio e uma prensa para fixação (Figura 7). O filme foi fixado na parte superior da placa de Petri com auxílio de parafina (Synth) previamente derretida a 60° C, de forma que somente a área da parte superior da placa coberta pelo filme permanecesse exposta (Figura 8). Como branco, foi utilizado o conjunto constituído pela placa de alumínio e filme, sem a presença da sílica. Tanto o conjunto dessecante como o branco foram armazenados em dessecadores com umidade relativa de 75% (cloreto de sódio padrão analítico). A massa do sistema

foi quantificada em balança analítica (Sartorius, mod. TE214S, Alemanha) em intervalos de 24 h durante 7 dias (ZACTITI e KIECKBUSCH, 2006). Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo utilizado um branco e três conjuntos dessecantes em cada ensaio.

Figura 7. Prensa utilizada para a fixação dos filmes utilizados nos ensaios de permeabilidade ao vapor de água

Figura 8. Branco (esquerda) e conjunto dessecante (direita) utilizados para os ensaios de permeabilidade ao vapor de água

Para a determinação da taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA), foram obtidas cinco medidas de espessura com auxílio de um micrômetro (Mitutoyo, mod. DIM863-1, Japão) de ponta plana, em posições aleatórias, para cada amostra de filme analisada.

A TPVA foi determinada pela eq. (1):

$$TPVA = \frac{w}{t \times A} \quad \text{eq. 1}$$

Em que:

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)

w/t = coeficiente angular do trecho reto obtido através da regressão linear da curva do ganho de massa em função do tempo (g.dia^{-1})

A = área do filme (m^2)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada pela eq. (2a) e eq. (2b):

$$\text{PVA} = \frac{\text{TPVA} \times e}{p_s \times (\text{UR}_1 - \text{UR}_2)} \quad \text{eq. 2a}$$

$$\text{PVA} = \frac{(w/t) \times e}{A \times p_s \times (\text{UR}_1 - \text{UR}_2)} \quad \text{eq. 2b}$$

Em que:

PVA = permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.m.s}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{Pa}^{-1}$)

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$)

w/t = coeficiente angular do trecho reto obtido através da regressão linear da curva do ganho de massa em função do tempo (g.s^{-1})

e = espessura média do corpo de prova (m)

p_s = pressão de saturação do vapor de água à temperatura da análise (mmHg)

UR_1 = umidade relativa dentro do dessecador (%)

UR_2 = umidade relativa no interior da placa de Petri (%)

4.2.4.2 Propriedades mecânicas

Para a determinação das propriedades mecânicas, corpos de prova retangulares (largura 2,5 cm e comprimento mínimo de 10 cm) dos filmes foram fixados entre as garras de tensão (probe A/TGT) e submetidas aos testes de tração, utilizando o analisador de textura (TA.XT2i, SMS, Reino Unido) conforme metodologia descrita na norma American Society for Testing Materials – ASTM D882-00 (2001). Para cada amostra de filme utilizado na análise, cinco medidas da espessura foram obtidas, em posições aleatórias, pelo uso do micrômetro de

ponta plana.

A distância entre as garras de tensão foi definida em 50 mm e a velocidade do ensaio foi definida em 0,001 m/s, conforme metodologia descrita por Zactiti e Kieckbusch (2006).

Os corpos de prova foram preparados após um acondicionamento mínimo de 48 h em dessecador (UR = 75%, T média = 25° C). Após a preparação, os mesmos foram novamente acondicionados, por um período mínimo de 48 h, em dessecador, com o objetivo de recondicionar os filmes após a manipulação.

A resistência máxima à tração foi calculada através da equação:

$$R_{\text{máx}} = \frac{F_{\text{máx}}}{A_{\text{min}}} \quad \text{eq. 3}$$

Sendo:

$R_{\text{máx}}$ = resistência máxima à tração (Pa)

$F_{\text{máx}}$ = força registrada no ponto de ruptura (N)

A_{min} = área mínima inicial do corpo de prova (m²)

Considerando a área mínima calculada como:

$$A_{\text{min}} = e_{\text{min}} \times L$$

e_{min} = espessura mínima inicial do corpo de prova (m)

L = largura inicial do corpo de prova (m)

O alongamento na ruptura foi calculado utilizando-se a equação:

$$\text{Alongamento na ruptura (\%)} = \left(\frac{L_T - L_0}{L_0} \right) \times 100 \quad \text{eq. 5}$$

Em que:

L_T = comprimento total do corpo de prova no momento da ruptura (m)

L_0 = distância inicial entre as garras (m)

Os valores para resistência máxima à tração e alongamento na ruptura foram obtidos a partir da média de 10 amostras de cada ensaio realizados em duplicata.

4.2.4.3 Atividade de água (a_w)

Para a determinação da atividade de água (a_w), amostras em triplicata de cada filme foram cortadas em pequenas fatias, a fim de se obter porções de aproximadamente 5 g que foram mensuradas em medidor de atividade de água (NOVASINA Aw Center, mod. AWC 503-C).

4.2.4.4 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes

A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes foi determinada pelo método da difusão em ágar de acordo com metodologia proposta por Maizura *et al.* (2007). Os filmes foram cortados em discos de 5 mm de diâmetro e dispostos sobre placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Oxoid) previamente semeado por profundidade com 200 μ L do inóculo (10^5 a 10^6 UFC/mL) de cada microrganismo avaliado. Para cada ensaio definido pelo planejamento experimental (4.2.3.4), cinco discos de filmes foram avaliados e o experimento foi realizado em triplicata. Os microrganismos avaliados e suas respectivas condições de incubação estão descritos nos itens 4.1.1.1 e 4.2.2.2, respectivamente. As placas foram avaliadas através da ausência de multiplicação microbiana ao redor dos filmes e o diâmetro total da zona de inibição foi mensurado em mm. A diferença entre área total da zona de inibição e a área do filme foi definida como a área de inibição (mm^2).

4.2.4.5 Atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango foi utilizado somente a formulação correspondente ao maior valor de zona de inibição (4.2.4.4) para todos os microrganismos avaliados. Para esta análise, amostras de, aproximadamente, 25 g de peito de frango refrigerado foram utilizadas como alimento modelo.

4.2.4.5.1 Preparo do inóculo de *Salmonella* spp.

A partir de culturas individuais de *S. GIVE* e *S. Enteritidis*, dois tubos contendo 5 mL de caldo tripticase soja (TSB, Oxoid) foram inoculados individualmente com as cepas selecionadas e incubados a 37° C por 24 h. Após o período de incubação, semeou-se, individualmente, 1 mL de cada cultura para erlenmeyers com 100 mL de TSB que foi novamente incubado a 37° C por 24 h. Após o período de incubação, 30 mL de cada cultura de *Salmonella* foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugados a 1600xg (centrífuga Hettich Mikro 22R, Tuttingen, Alemanha) por 10 min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 30 mL de água peptonada 0,1%. Após este processo, 15 mL de cada cultura de células de *Salmonella* ressuspensionada foi transferida para um único tubo de centrífuga, totalizando, 30 mL de cultura de *Salmonella* spp. sendo esta considerada o "pool" de *Samonella*. Estes 30 mL foram novamente centrifugados a 6000 rpm por 10 min a 4° C e o sedimento ressuspensionado em água peptonada 0,1% foi ajustado em espectrofotômetro a fim de se obter um inóculo com densidade ótica (DO) de aproximadamente 0,50 a 630 nm equivalente a um inóculo de 10⁸ UFC/mL, conforme padronizado previamente.

4.2.4.5.2 Preparo do inóculo de *Pseudomonas* spp.

Para o preparo do inóculo de *Pseudomonas* spp., foram utilizadas culturas individuais de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* e *P. putida*. O mesmo procedimento utilizado no item 4.2.4.5.1 foi adotado para o preparo do "pool" de *Pseudomonas*, considerando o período de incubação para *P. aeruginosa* de 24 h a 37° C e para *P. fluorescens* e *P. putida* de 24 h a 25° C. Após as duas lavagens das células em água peptona 0,1%, a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a fim de se obter um inóculo com DO de aproximadamente 0,6 a 630 nm equivalente a 10⁷ UFC/mL, conforme previamente padronizado.

4.2.4.5.3 Preparo do inóculo de *L. monocytogenes*

Para o preparo do inóculo de *L. monocytogenes*, o mesmo procedimento adotado em 4.2.4.5.1 foi utilizado para o preparo da suspensão de *L. monocytogenes*, considerando o meio de cultura para a inoculação do

microrganismo o caldo tripticase de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSBYE, Oxoid). Após as duas lavagens das células em água peptona 0,1%, a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a fim de se obter um inóculo com DO de aproximadamente 0,5 a 630 nm, equivalente a 10^8 UFC/mL conforme padronizado previamente.

4.2.4.5.4 Atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango contra *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango contra *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., as amostras de peito de frango refrigerado utilizadas foram adquiridas no dia inicial da análise em supermercado da cidade de São Paulo. Nestes ensaios, a porção de 25 g de peito de frango foi contaminada superficialmente com 50 μ L do inóculo a 10^6 UFC/mL a fim de se obter uma população inicial de 10^3 UFC/mL. Em seguida, a amostra de frango foi coberta com o filme antimicrobiano de modo que todas as faces da amostra ficassem em contato com o filme, como apresentado na Figura 9.

Figura 9. Amostra de peito de frango embalada com o filme antimicrobiano

A análise foi realizada em duplicata com três repetições. Cada experimento foi composto por uma amostra de frango inoculado com um microrganismo teste e embalado com o filme desenvolvido acompanhada por três condições controle: (a) frango sem o microrganismo e sem o filme; (b) frango com o microrganismo e sem o filme e, (c) frango sem microrganismo e com o filme. Todas as amostras foram acondicionadas individualmente em sacos de amostragem estéreis e armazenadas sob refrigeração a 7° C.

As análises microbiológicas foram realizadas no dia inicial da realização do

teste (No) e após 5 dias (Nf) - período máximo da vida-de-prateleira de cortes de frango refrigerados (HILTON Jr, CASON e INGRAM, 2004).

4.2.4.5.5 Atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango contra *Pseudomonas* spp.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango contra *Pseudomonas* spp., as amostras de peito frango foram submetidas à irradiação a fim de eliminar e/ou reduzir a microbiota acompanhante de *Pseudomonas*.

As amostras de peito de frango refrigerado foram porcionadas em pedaços de aproximadamente 25 g, acondicionadas em sacos de polietileno, selados e congelados em congelador doméstico por 24 h. As amostras embaladas e congeladas foram acondicionadas em caixa de material termoisolante com gelo e transportadas para o Centro de Tecnologia da Radiação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN/USP) para serem irradiadas em um irradiador de fonte ^{60}Co . A caixa foi irradiada, na modalidade estática, a uma distância da fonte correspondente a uma taxa de dose de 4kGy/h, com acompanhamento da dose de radiação por dosímetros de alanina. A irradiação foi realizada na posição da caixa 0° e 180°, sendo metade de uma dose aplicada numa posição e a outra metade na outra posição, procurando-se com esse procedimento, homogeneizar a dose aplicada. O tempo de irradiação foi calculado para se obter uma dose de 5 kGy. Após a irradiação, as amostras foram armazenadas em congelador até a realização das análises.

Para a realização do ensaio da atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas* spp., as amostras de frango previamente irradiadas foram descongeladas em refrigerador a 4° C. Em seguida, foi utilizado procedimento análogo ao descrito em 4.2.4.5.4.

4.2.4.6 Análise Microbiológica

4.2.4.6.1 Preparo das amostras

Para os ensaios controle onde o filme antimicrobiano não foi utilizado para a

cobertura dos pedaços de frango, foram adicionados diretamente ao saco de amostragem 225 mL de água peptonada 0,1% que foram homogeneizados com 25 g do pedaço de frango por 1 min em *stomacher*. A partir desse homogeneizado, foram realizadas diluições decimais, usando como diluente água peptonada 0,1%.

Para os ensaios onde o filme antimicrobiano foi utilizado na cobertura dos pedaços de frango, o filme foi removido assepticamente com auxílio de uma pinça esterelizada previamente à adição do diluente. As etapas posteriores foram semelhantes ao descrito anteriormente.

4.2.4.6.2 Pesquisa de *Salmonella* spp. (ANDREWS *et al.*, 2001, modificado)

Para os ensaios controle, onde não foi realizada a contaminação do microrganismo na amostra de frango, 225 mL de caldo lactosado (Oxoid) foi adicionado ao saco de amostragem contendo a amostra de 25 g de frango. O conteúdo foi homogeneizado em *stomacher* por 1 min e incubado a 37° C por 24 h. Decorrido esse período, 0,1 mL do caldo lactosado foi transferido para 10 mL de caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis (Oxoid), e 1 mL do caldo lactosado foi adicionado a 10 mL do caldo tetrationato (Oxoid) e ambos foram incubados a 43° C por 24 h. Decorrido o período de incubação, os dois caldos foram semeados em placas de ágar Hektoen Enteric (Oxoid) e ágar MLCB (Oxoid) e incubados a 37° C por 24 h. As colônias com características de *Salmonella* spp. nesses meios foram inoculadas em tubos com ágar ferro lisina (Oxoid) e ágar tríplice açúcar ferro (Oxoid) e os tubos foram incubados a 37° C por 24 h. Posteriormente, as colônias características foram submetidas a outras provas bioquímicas (EPM, Mili e Citrato – Enterokit B – Probac Brasil) e de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella*.

4.2.4.6.3 Enumeração de *Salmonella* spp.

A partir das diluições obtidas em 4.2.4.6.1, semeou-se em duplicata por profundidade 1 mL de cada diluição em ágar MLCB. As placas foram incubadas a 37° C por 24 h e os resultados foram expressos em UFC/g.

4.2.4.6.4 Pesquisa de *L. monocytogenes* (HITCHINS, 2003, modificado)

Para os ensaios controle, onde não foi realizada a contaminação do microrganismo na amostra de frango, 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (Fraser - Oxoid) adicionado de suplemento seletivo Fraser (Oxoid) foi adicionado ao saco de amostragem contendo a amostra de 25 g de frango. O conteúdo foi homogeneizado em *stomacher* por 1 min e incubado a 37° C por 24 h e 48 h. Após 24 h e 48 h, uma alíquota foi semeada em placas contendo ágar Palcam (Oxoid) e ágar Oxford (Oxoid) adicionada de suplemento seletivo (Oxoid) que foram incubadas a 37° C por 48 h. Colônias típicas de *Listeria* foram semeadas em ágar tripticase de soja com extrato de levedura (TSA-YE, Oxoid) e incubadas a 37° C por 24 h e submetidas à identificação bioquímica, através de testes de produção de catalase, fermentação de carboidratos e motilidade a 25° C.

4.2.4.6.5 Enumeração de *L. monocytogenes*

A partir das diluições obtidas em 4.2.4.6.1, semeou-se em duplicata por profundidade 1 mL de cada diluição em ágar Oxford adicionado de suplemento seletivo. As placas foram incubadas a 37° C por 48 h e os resultados foram expressos em UFC/g.

4.2.4.6.6 Enumeração de *Pseudomonas* spp. (ARNAUT-ROLLIER, ZUTTER e HOOF, 1999)

A partir das diluições obtidas em 4.2.4.6.1, semeou-se em duplicata por profundidade 1 mL de cada diluição em ágar base para *Pseudomonas* (PAB, Oxoid) suplementado com 5 mL de glicerol (Synth) e suplemento seletivo para *Pseudomonas* C-F-C (Oxoid). As placas foram incubadas a 25° C por 48 h e os resultados foram expressos em UFC/g.

4.2.4.6.7 Contagem total de aeróbios psicotróficos (COUSIN, JAY e VASAVADA, 2001)

A partir de cada diluição obtida em 4.2.4.6.1, semeou-se em duplicata com

auxílio de alça de Drigalski, 0,1 mL na superfície de placas contendo ágar padrão para contagem (PCA, Oxoid). As placas foram incubadas a 7º C por 7 a 10 dias e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de alimento (UFC/g).

4.2.4.6.8 Contagem total de aeróbios mesófilos (MORTON, 2001)

A partir de cada diluição obtida em 4.2.4.6.1, semeou-se em duplicata com auxílio de alça de Drigalski, 1 mL na superfície de placas contendo ágar PCA (Oxoid). As placas foram incubadas a 37º C por 48 h e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de alimento (UFC/g).

4.2.4.7 Análise sensorial

A análise sensorial teve como objetivo comparar a aceitação do consumidor através do teste de preferência indireta com a utilização de uma escala hedônica de 9 pontos, onde a opinião do provador varia numa escala entre “desgostei extremamente” e “gostei extremamente”. Duas amostras foram apresentadas ao provador, sendo uma amostra de peito de frango *in natura* no qual a cobertura de filme comestível com OE de cravo foi utilizada como embalagem primária e uma amostra controle.

As amostras de peito de frango refrigerado utilizadas foram adquiridas em supermercados da cidade de São Paulo. Estas amostras foram porcionadas em pedaços de, aproximadamente, 25 g de tamanho e formato semelhantes. Tanto as amostras controle como as amostras na qual o filme adicionado de OE de cravo foi utilizado, foram armazenados por 2 dias a 7º C previamente a realização da análise sensorial.

O painel sensorial foi composto por 50 provadores não treinados, com idade entre 18 e 60 anos que avaliaram o aroma do produto *in natura*. As amostras ficaram acondicionadas em refrigerador doméstico até o momento da realização da análise sensorial, sendo a camada de filme comestível retirada antes da análise pelo provador. Cada amostra foi apresentada em pratos brancos descartáveis, codificados com números de três dígitos. As amostras foram avaliadas sob luz branca em cabines individuais, no Laboratório de Análise

Sensorial de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, em São Paulo, SP.

4.2.4.8 Análise estatística

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana e propriedade de barreira ao vapor de água foram realizados através do *software* STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., USA), considerando o erro puro. A partir dos dados das variáveis independentes, utilizou-se o procedimento *Industrial Statistics & Six Sigma* e a função *Experimental Design, Central Composite, non Factorial, Surface Design* do *software* Statistica 7.0 para a análise dos efeitos dos fatores estudados e para a construção da superfície de resposta.

De acordo com Myers e Montgomery (2002), os resultados obtidos a partir do planejamento experimental podem ser ajustados a um modelo do tipo:

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2$$

Em que: $E(y)$ é a resposta predita pelo modelo, β_0 é a constante, β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} são os coeficientes da regressão, e x_1 e x_2 representam as variáveis independentes estudadas. A qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais foi verificada através da análise de variância (ANOVA) da regressão e o coeficiente de correlação (R^2), na qual as repetições forneceram graus de liberdade para obtenção do erro puro e conseqüentemente, análise da falta de ajuste.

Para os ensaios de caracterização do filme frente às propriedades mecânicas e de barreira o intervalo de confiança adotado foi de 5% ($p < 0,05$), enquanto o intervalo de confiança de 10% ($p < 0,10$) foi utilizado para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes.

O teste de Duncan foi aplicado para a análise de diferenças significativas entre ensaios considerando o intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. EM CARNE DE FRANGO

Como não havia cepas de *Pseudomonas* spp. na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP, foi necessário o isolamento desse microrganismo.

Das 24 amostras de coxinha da asa analisadas 100% apresentaram positividade para *Pseudomonas* spp. Destas, 68,7% foram identificadas como *P. fluorescens*, 25% foram identificadas como *P. putida* e 6,3% *Pseudomonas* spp.

Foi observado que 66,7% do total de isolados identificados como *P. fluorescens* foram capazes de produzir o pigmento fluoresceína (Figura 25 – ANEXO 1). De fato, como observado por Arnaut-Rollier, Zutter e Van Hoof (1999), alguns sorogrupos de *P. fluorescens* não são capazes de produzir pigmento fluorescente.

Inúmeros autores trabalharam com a identificação de *Pseudomonas* spp. em carne de frango (SUNDHEIM, SLETTEN e DAINITY, 1998; ARNAUT-ROLLIER, ZUTTER e VAN HOOFF, 1999) e carne bovina (SHAW e LATTY, 1982; ASLAM e SERVICE, 2008) e também identificaram a *P. fluorescens* como microrganismo mais freqüente. Porém, ao contrário deste trabalho, a segunda espécie mais isolada foi *P. fragi* seguida por *P. putida*.

Dessa forma, para os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima de óleos essenciais, foram escolhidas 2 cepas de *P. fluorescens* (QaF01 e Lb03), produtoras de pigmento fluoresceína, e 2 cepas de *P. putida* (Ia03 e Kb04). Ambas as espécies escolhidas apresentaram porcentagem de identificação no kit de identificação bioquímica API® 20 NE de 99,9%.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Para a determinação da CIM, foram analisados os seguintes óleos essenciais: alho, cebola, cravo, gengibre africano, gengibre chinês, hortelã,

laranja (2 fornecedores diferentes), natural de laranja doce, laranja 5X, limão Siciliano, limão Siciliano 5X e pimenta preta.

Com exceção da cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (isolada de hemocultura), as demais cepas utilizadas para o ensaio de determinação da CIM foram isoladas de carne de frango. Foram escolhidas cepas de bactérias Gram negativas e Gram positivas para avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais selecionados, uma vez que o espectro de ação dos compostos ativos presentes nos óleos essenciais é variável.

A eficácia de um composto antimicrobiano é relacionada com sua respectiva CIM, ou seja, a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir a multiplicação do microrganismo alvo (BURT e REINDERS, 2003).

De acordo com Mann e Markham (1998), diferentes métodos são utilizados para a determinação da CIM como, por exemplo, os métodos de difusão e métodos de diluição em ágar ou caldo. No entanto, sabe-se que para a avaliação da CIM de OE, métodos de difusão, seja por difusão em poços ou discos de papel filtro, não são recomendados, pois a difusão das partículas oleosas é dificultada pela não afinidade com a água presente no ágar. Os métodos de diluição em ágar ou caldo são comumente utilizados para a determinação da CIM de OE, metodologia essa que consiste na incorporação do OE diretamente em meio de cultura.

Sabendo que os OE são imiscíveis em água, torna-se necessária a incorporação de um agente emulsificante ou tensoativo no meio de cultura para garantir o contato entre o agente antimicrobiano e o microrganismo alvo durante a realização do experimento. Dessa forma, além de garantir a estabilização do OE, facilita-se o estudo de suas propriedades antimicrobianas proporcionando resultados mais confiáveis.

Alguns trabalhos relatam a utilização de agentes tensoativos tais como Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitana), Tween 20 (polioxietileno monolaurático) e etanol para a solubilização de OE (CHAND *et al.*, 1994; HAMMER, CARSON e RILEY, 1999; FISHER e PHILIPS, 2006). No entanto, Schmolka (1973) *apud* Mann e Markham (1998) relatam que a utilização de

agentes surfactantes não-iônicos, como o Tween 80 e o Tween 20, podem alterar algumas propriedades físico-químicas do OE, diminuindo sua ação antimicrobiana.

Burt e Reinders (2003) avaliaram a utilização de lecitina, agente emulsificante comumente utilizado na indústria alimentícia, para a estabilização de diferentes óleos essenciais e verificar a ação antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7. Entretanto, foi verificado que a presença de lecitina reduziu a atividade antimicrobiana desses óleos essenciais. As hipóteses levantadas pelos autores foram que a lecitina poderia ter dificultado as interações entre o OE e a membrana celular bacteriana, uma vez que este componente estaria disposto entre o OE e a fase aquosa do meio; componentes presentes no OE poderiam ter atuado nos fosfolipídeos presentes na membrana celular da bactéria, porém, esse efeito pode ter sido neutralizado pela presença da lecitina, fonte adicional de fosfolipídeos e; por fim, alguns ácidos graxos livres presentes na lecitina poderiam ter sido utilizados pela bactéria como forma adicional de proteção de sua membrana celular contra os compostos fenólicos presentes em OE.

A utilização de uma emulsão de OE em 10% de amido modificado (Purity gum Be) suspenso em água foi utilizada por Oussalah *et al.* (2006b), Oussalah *et al.* (2007a) e Turgis *et al.* (2009) em trabalhos envolvendo a avaliação de diferentes óleos essenciais contra bactérias patogênicas e deteriorantes. A utilização de amido modificado apresenta-se como uma nova alternativa para a estabilização de emulsões envolvendo OE.

O amido modificado Purity gum Be, derivado de milho ceroso, apresenta modificações químicas que o tornam capaz de atuar como estabilizante no preparo de emulsões sem alterar a viscosidade do produto. Devido à capacidade de solubilizar-se em água fria e não perder a estabilidade após passar por tratamento térmico, este produto atua de forma semelhante à goma arábica que, entretanto, solubiliza-se somente a quente, porém com um custo mais baixo. É utilizado principalmente por indústrias de bebidas carbonatadas no preparo de emulsões envolvendo aromas e óleos essenciais (NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION, 2009).

Conforme apresentado na Tabela 4, de todos os óleos essenciais avaliados,

somente o óleo essencial de cravo mostrou-se efetivo para a inibição de todas as cepas avaliadas. A utilização de óleo essencial de cravo na concentração de 0,2% promoveu a inibição da multiplicação de *S. Give*, *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* e *P. putida*, enquanto a concentração de 0,05% do mesmo óleo essencial foi eficiente na inibição de *L. monocytogenes*. A utilização de óleo essencial de alho nas concentrações de 0,05% e 0,2% foi efetivo para a inibição de *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente; já a utilização de óleo essencial de cebola na concentração de 0,05% foi suficiente para a completa inibição dos mesmos microrganismos. Os óleos essenciais de limão Siciliano 5X e hortelã somente foram efetivos para a inibição de *L. monocytogenes* quando utilizados na concentração de 0,4% e 0,8%, respectivamente.

Os OE de gengibre e laranja doce não apresentaram efeito antimicrobiano na concentração máxima avaliada (0,8%) contra *L. monocytogenes* e *P. putida*. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Oussalah *et al.* (2006b) e Oussalah *et al.* (2007a). Já para o OE de cravo, foi observado que a CIM de 0,1% para *P. putida* e 0,2% para *L. monocytogenes* obtido por esses autores foram, respectivamente, abaixo (CIM=0,2%) e acima (CIM=0,05%) do encontrado neste trabalho. Oussalah *et al.* (2006b) e Oussalah *et al.* (2007a) também avaliaram o OE de limão e não verificaram sua ação antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. Neste estudo, foram avaliados OE de limão Siciliano e limão Siciliano concentrado 5X que apresentam como principal composto ativo o limoneno, responsável pelo efeito antimicrobiano conferido aos OE extraídos de frutas cítricas, porém, observou-se que somente o OE concentrado obteve um efeito antimicrobiano com a CIM de 0,4% para *L. monocytogenes*.

Apesar da existência de muitos outros trabalhos avaliando a eficiência de OE como agente antimicrobiano, decidiu-se por comparar os resultados somente com os dos autores citados pois utilizamos a mesma técnica. Além das diferenças nas metodologias adotadas por diversos autores, outros fatores contribuem para a variação dos resultados, como o local geográfico do cultivo da planta, clima e estação do ano da colheita, genótipo da planta e diferenças no processo de extração do óleo. Estes fatores influenciam na composição e na concentração de cada constituinte extraído dos óleos essenciais (BURT e REINDERS, 2003).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CIM) de óleos essenciais para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Give, *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas fluorescens* (QaF01 e Lb03), *P. putida* (Ia03 e Kb04) e *P. aeruginosa* ATCC 27853

[illegible]

5.3 DESENVOLVIMENTO DO FILME À BASE DE ALGINATO

Sabendo que a aplicação do filme em carne de frango será avaliada sensorialmente, objetivou-se trabalhar no desenvolvimento de uma formulação somente com ingredientes de grau alimentício. Dessa forma, não foi possível adotar integralmente a formulação proposta por Oussalah *et al.*, (2006a), pois os ingredientes utilizados eram de padrão analítico.

Embora muitas pesquisas demonstrem a eficácia da utilização de filmes e coberturas comestíveis à base de alginato em alimentos, a maioria das referências cita a utilização de alginato de sódio padrão analítico em trabalhos envolvendo alimentos (OUSSALAH *et al.*, 2006a; OUSSALAH *et al.*, 2006b; SALMIERI e LACROIX, 2006; ZACTITI e KIECKBUSCH *et al.*, 2006; OUSSALAH *et al.*, 2007a; MAFTOONAZAD, RAMASWAMY e MARCOTTE, 2008; ROOPA e BHATTACHARYA, 2008, ROOPA e BHATTACHARYA, 2009). O emprego de alginato de sódio grau alimentício é relatado apenas em pesquisas que o utilizam como cobertura (MAIZURA *et al.*, 2007; RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2008; TAPIA *et al.*, 2008).

5.3.1 ENSAIOS PRELIMINARES

A partir dos resultados obtidos pelos ensaios preliminares, observou-se que as formulações F1 (alginato de sódio 3,0%) e F2 (alginato de sódio 2,5%) apresentaram maior facilidade na etapa de remoção do filme da placa de Petri após 20 h e 22 h de secagem em estufa a 40° C, respectivamente. Já para as formulações F3 (alginato de sódio 2,0%) e F4 (alginato de sódio 1,5%), os tempos de secagem foram superiores ao das formulações F1 e F2 chegando a 26 h de secagem em estufa.

Decidiu-se trabalhar somente com a formulação F1 na etapa de imersão em solução de cloreto de cálcio devido ao menor tempo de secagem apresentado. Como apresentado na Figura 10 B, foi observado que mesmo com a remoção do excesso de cloreto de cálcio, o filme apresentou uma estrutura enrugada, rígida e difícil de manusear.

Figura 10. Filme à base de alginato: (A) antes da etapa de imersão em CaCl_2 e (B) após a etapa de imersão sem a remoção do excesso de CaCl_2

Dessa forma, para diminuir o enrugamento observado na Figura 10 B, após a etapa de imersão por 5 min em solução de cloreto de cálcio, realizou-se uma etapa de remoção do excesso de cloreto de cálcio por lavagem com água destilada com base no estudo desenvolvido por Zactiti e Kieckbusch (2006). Após secagem em estufa, os filmes apresentaram a aparência observada na Figura 11.

Apesar de ainda ser observado um enrugamento na estrutura do filme após a remoção do excesso de cloreto de cálcio pela etapa de lavagem em água destilada, o mesmo se apresentou mais maleável. A etapa de imersão em solução de cloreto de cálcio é necessária para diminuir o caráter hidrofílico dos filmes à base de alginato, uma vez que os blocos estruturais polianiônicos de ácidos manurônico (M) e gulurônico (G) presentes no alginato são capazes de formar ligações iônicas intermoleculares na presença de cátions di ou multivalentes, como o Ca^{2+} , por exemplo (GRANT *et al.*, 1973; GACESA, 1988).

Figura 11. Filme à base de alginato após a imersão em CaCl_2 e realização da etapa de lavagem em água destilada

Foi observado que a utilização de cloreto de cálcio a 20% na etapa de imersão proporcionou um maior enrugamento na estrutura dos filmes e o aparecimento de cristais de sal na superfície após a etapa de secagem. Oussalah *et al.* (2006a) compararam o tratamento por imersão dos filmes à base de alginato em 2 ou 20% de solução de cloreto de cálcio e além de observarem taxas similares de liberação dos compostos ativos de óleos essenciais através da determinação dos compostos fenólicos totais, os valores de enumeração para *S. Typhimurium* foram semelhantes independentemente do tipo de tratamento escolhido.

5.3.2 FORMULAÇÃO FINAL

Apesar da diminuição do enrugamento do filme após a etapa de lavagem com água destilada (Figura 11), observou-se que em alguns trabalhos (RHIM, 2004; ZACTITI E KIECKBUSCH, 2006 e SILVA, BIERHALZ e KIECKBUSCH, 2009) adicionava-se o cloreto de cálcio diretamente na formulação do filme à base de alginato previamente a etapa de imersão para *crosslinking* complementar. No entanto, a adição de cloreto de cálcio deve ser realizada de forma controlada e sob alta velocidade de agitação (2000 rpm) a fim de se obter uma suspensão homogênea. Os filmes formados a partir da utilização desse procedimento apresentaram a diminuição do enrugamento de sua estrutura como observado na Figura 12.

Figura 12. Filme à base de alginato com adição de cloreto de cálcio na formulação: (A) antes da etapa de *crosslinking* complementar em solução de cloreto de cálcio e (B) após a etapa de *crosslinking* complementar em solução de cloreto de cálcio.

No entanto, a total eliminação do enrugamento na estrutura dos filmes somente foi possível após a mudança no procedimento de realização da etapa de *crosslinking* complementar. Diferentes procedimentos foram observados em estudos relatados em literatura: processo de imersão (OUSSALAH *et al.* 2006a); processo de pulverização (ZACTITI E KIECKBUSCH, 2006 e SILVA, BIERHALZ e KIECKBUSCH, 2009) e adição da solução de cloreto de cálcio diretamente às placas contendo os filmes já secos (RHIM, 2004).

Dentre os diferentes procedimentos, somente o processo de imersão dos filmes e de adição da solução de cloreto de cálcio diretamente às placas contendo os filmes já secos foram avaliadas, sendo este último, definido como metodologia final para a etapa de *crosslinking* complementar. Os filmes formados a partir da utilização deste procedimento apresentaram a estrutura observada na Figura 13.

Figura 13. Filme à base de alginato com adição de cloreto de cálcio na formulação e após a realização da etapa de *crosslinking* complementar pela adição da solução de cloreto de cálcio diretamente à placa contendo o filme previamente seco

Desta forma, a formulação base do filme à base de alginato foi definida como: alginato de sódio (3,0%), glicerina bi-destilada (2,0%) e água destilada (95,0%). O processo final de elaboração dos filmes foi realizado baseado na metodologia descrita por Rhim (2004) e Zactiti e Kieckbusch (2006), na qual a glicerina bi-destilada foi totalmente solubilizada em água destilada previamente à adição do alginato de sódio. Observou-se uma maior facilidade na solubilização da glicerina antes da adição do alginato do que após sua adição, como proposto por Oussalah *et al.* (2006a).

O tempo final de secagem dos filmes foi definido em 20 h a 40° C e a etapa de *crosslinking* complementar com solução cloreto de cálcio a 2% foi realizada com a adição da solução diretamente às placas contendo os filmes previamente secos, sendo necessária uma etapa de lavagem com água destilada para a remoção do excesso de cloreto de cálcio.

5.3.3 PROPRIEDADE DE BARREIRA AO VAPOR DE ÁGUA

Os valores da permeabilidade ao vapor de água (PVA) calculados de acordo com a eq. 2b (p. 25) encontram-se na Tabela 5. Estes valores referem-se apenas aos ensaios que envolveram a etapa de *crosslinking* complementar com cloreto de cálcio, uma vez que esta etapa é necessária para a manutenção da integridade do filme quando este for aplicado em alimento.

Tabela 5. Valores médios da permeabilidade ao vapor de água (PVA) após etapa de *crosslinking* complementar com cloreto de cálcio dos filmes obtidos a partir dos ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental

Ensaio	PVA (g.m.m ⁻² .s ⁻¹ .Pa ⁻¹) x 10 ⁻¹¹
1	1,72 ± 0,21
2	0,88 ± 0,07
3	1,82 ± 0,17
4	1,21 ± 0,13
5	1,45 ± 0,23
6	0,48 ± 0,06
7	0,63 ± 0,06
8	2,15 ± 0,11
9	1,02 ± 0,16
10	1,07 ± 0,12
11	1,06 ± 0,18

T = 25° C, UR=75%

Os níveis utilizados para a elaboração dos ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados no item 4.2.3.4. Observou-se que a mudança na concentração de OE cravo e cloreto de cálcio adicionado na formulação dos filmes proporcionou uma variação na permeabilidade ao vapor de água de $0,48 \pm 0,06$ (g.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹)x10⁻¹¹ (CaCl₂ a 0,1% e OE cravo a 0,6%) a $2,15 \pm 0,19$ (g.m.m⁻².s⁻¹.Pa⁻¹)x10⁻¹¹ (CaCl₂ a 0,06% e OE cravo a 1,0%).

Através dos resultados do planejamento é possível determinar os coeficientes de regressão (Tabela 6) para a resposta de interesse (permeabilidade ao vapor de água), calcular as análises de variância (Tabela 7) e construir as superfícies de resposta.

Considerando significativos os parâmetros com p-valores menores que 5% (p<0,05), observou-se que somente o termo quadrático para a concentração de CaCl₂ (p=0,3102) (Tabela 6) não foi significativo sendo este incorporado aos resíduos (fonte de variação *lack of fit*) para o cálculo da ANOVA apresentada na (Tabela 7).

Tabela 6. Coeficientes de regressão para a variável resposta permeabilidade ao vapor de água

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Média	1,05	0,02	68,73	0,0002	0,98	1,12
CaCl ₂ (%) (L)	-0,35	0,02	-37,71	0,0007	-0,79	-0,62
CaCl ₂ (%) (Q)	0,02	0,02	1,35	0,3102	-0,07	0,13
OE cravo (%) (L)	0,32	0,02	34,47	0,0008	0,56	0,72
OE cravo (%) (Q)	0,23	0,02	20,43	0,0024	0,36	0,55
CaCl ₂ xOE cravo	0,06	0,03	4,35	0,0491	0,001	0,23

Tabela 7. ANOVA para a permeabilidade ao vapor de água

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	0,9953	1	0,9953	1421,87	0,0007
CaCl ₂ (%) (Q)	0,0012	1	0,0012	1,815	0,3102
OE cravo (%) (L)	0,8317	1	0,8317	1188,27	0,0008
OE cravo (%) (Q)	0,2922	1	0,2922	417,52	0,0023
CaCl ₂ xOE cravo	0,0132	1	0,0132	18,89	0,0490
Lack of Fit	0,4761	3	0,1587	226,75	0,0043
Erro puro	0,0014	2	0,0007		
Total	2,6268	10			

$$R^2 = 0,82; F_{0,90; 3; 7} = 4,53; F\text{-calc} = 6,73$$

Sabendo que o termo quadrático para a concentração de CaCl₂ não foi significativo, este termo não foi incorporado ao modelo. O modelo final com as variáveis codificadas que representa a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) $\times 10^{-11}$ em função da concentração de CaCl₂ e concentração de OE cravo na faixa estudada está apresentado na equação:

$$\text{PVA} = 1,05 - 0,35[\text{CaCl}_2] + 0,32[\text{OEcravo}] + 0,23[\text{OEcravo}]^2 + 0,06[\text{CaCl}_2]x[\text{OEcravo}]$$

A partir do modelo apresentado, verificou-se que a adição de CaCl₂ à formulação dos filmes reduziu os valores de permeabilidade ao vapor de água, enquanto a adição de OE cravo foi responsável pelo aumento desses valores. A representação gráfica para o modelo obtido encontra-se na Figura 14 e o gráfico de valores experimentais versus valores previstos, que representa o ajuste dos valores experimentais para os valores estabelecidos pelo modelo encontra-se na Figura 15.

Fitted Surface; Variable: PVA ($\text{g.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) $\times 10^{-11}$
 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0007
 DV: PVA ($\text{g.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) $\times 10^{-11}$

Figura 14. Superfície de resposta para permeabilidade ao vapor de água ($\text{g.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) $\times 10^{-11}$ em função da concentração de OE cravo (%) e concentração de CaCl₂ (%)

Figura 15. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a resposta permeabilidade ao vapor de água

Através da análise de superfície de resposta, observa-se que os menores valores para permeabilidade ao vapor de água encontram-se nas faixas de máxima concentração de CaCl_2 e mínima concentração de OE cravo.

De acordo com Myers e Montgomery (2002), valores de R^2 entre 0,85 e 0,90 são considerados bons modelos para explicar a variação existente no processo estudado. Dessa forma, o coeficiente de correlação R^2 (0,82) obtido sugere que o modelo ajustado é capaz de explicar 82% do total de variação existente no processo. O valor de F-calculado obtido a partir do modelo estudado foi superior ao valor de F-tabelado indicando que o modelo apresentado é significativo. O ajuste do modelo também pode ser observado na Figura 15, no qual os pontos experimentais e os valores observados encontram-se próximos à reta de ajuste.

Para a validação do modelo apresentado e da superfície de resposta, foi realizada a repetição de um dos ensaios definidos pelo planejamento, juntamente com a adição de dois diferentes ensaios. Os resultados experimentais referentes à permeabilidade ao vapor de água para estes ensaios e os valores previstos pelo modelo encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Valores da permeabilidade ao vapor de água (PVA) experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	PVA experimental (g.m.m ⁻² .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)x10 ⁻¹¹	PVA previsto (g.m.m ⁻² .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)x10 ⁻¹¹	Desvio (y-y') *	Desvio relativo PVA (%)
3 *	0,0316	0,884	1,78 ± 0,14	1,50	0,28	15,73
A	0,0316	1,0	2,02 ± 0,11	1,59	0,43	21,29
B	0,02	0,884	1,82 ± 0,21	1,51	0,31	17,03

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Os resultados obtidos para a validação do modelo sugerem que o aumento da permeabilidade ao vapor de água é mais afetado pelo aumento da concentração de OE cravo adicionado à formulação do filme do que pela diminuição da concentração de CaCl_2 , o que, de fato, pode ser observado na superfície de resposta (Figura 14) indicando que o modelo apresentado é significativo.

Os resultados encontrados para a permeabilidade ao vapor de água são

coerentes aos já relatados na literatura. Maizura *et al.* (2007) verificaram que os filmes de alginato e amido de sagu com maiores concentrações de glicerol e OE de capim-limão apresentaram valores de permeabilidade ao vapor de água mais elevados comparados aos filmes onde menores concentrações foram utilizadas. O aumento nos valores de permeabilidade pode estar relacionado a modificações na estrutura do filme ocasionadas pela adição de glicerol e OE, uma vez que a adição desses componentes proporciona um aumento na flexibilidade da estrutura polimérica do filme contribuindo para o aumento na absorção de água.

Por outro lado, observa-se uma redução da permeabilidade ao vapor de água quando se adiciona cloreto de cálcio o que concorda com o relatado por Zactiti e Kieckbusch (2006). Esses autores avaliaram cinco diferentes concentrações de cloreto de cálcio (2%, 3%, 4%, 5% e 7%) na etapa de *crosslinking* complementar para a reticulação de filmes de alginato. Os valores de permeabilidade ao vapor de água obtidos foram comparados com os de filmes onde não houve o processo de reticulação (controle) e com valores de permeabilidade ao vapor de água de filmes onde foi utilizada uma etapa adicional de adição de cloreto de cálcio (0,03%) à formulação do filme. Constatou-se que a etapa de *crosslinking* complementar foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes quando comparado ao filme controle.

5.3.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Os valores da resistência máxima à tração dos filmes calculados de acordo com a eq. 3 (p. 27) encontram-se na Tabela 9. Estes valores referem-se apenas aos ensaios que envolveram a etapa de *crosslinking* complementar com cloreto de cálcio, uma vez que esta etapa é necessária para a manutenção da integridade do filme quando este for aplicado em alimento.

Tabela 9. Valores médios da resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) e alongamento na ruptura (%) após etapa de *crosslinking* complementar com cloreto de cálcio dos filmes obtidos a partir dos ensaios estabelecidos pelo delineamento experimental

Ensaio	$R_{m\acute{a}x}$ (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
1	121,4 ± 8,01	25,64 ± 2,41
2	134,2 ± 6,58	6,35 ± 0,78
3	122,2 ± 7,32	32,45 ± 2,12
4	137,1 ± 7,92	8,83 ± 0,96
5	118,8 ± 7,01	36,85 ± 2,08
6	141,4 ± 6,87	5,08 ± 0,35
7	121,5 ± 7,63	8,65 ± 0,54
8	127,5 ± 7,04	17,32 ± 1,98
9	122,0 ± 7,02	11,32 ± 1,64
10	121,8 ± 7,14	10,45 ± 1,45
11	121,5 ± 6,47	10,98 ± 1,03

Os níveis utilizados para a elaboração dos ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados na 4.2.3.4. Observou-se que a mudança na concentração de OE cravo e cloreto de cálcio adicionado à formulação dos filmes proporcionou uma variação na resistência máxima à tração de 118,8 MPa (CaCl_2 a 0,02% e OE cravo a 0,6%) a 141,4 MPa (CaCl_2 a 0,1% e OE cravo a 0,6%), enquanto que o alongamento máximo na ruptura variou de 5,08% (CaCl_2 a 0,1% e OE cravo a 0,6%) a 36,85 (CaCl_2 a 0,02% e OE cravo a 0,6%).

Tanto para o cálculo de resistência máxima à tração ($R_{m\acute{a}x}$) quanto para determinação do alongamento máximo na ruptura, foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 5% ($p < 0,05$). Dessa maneira, para $R_{m\acute{a}x}$ todos os termos (lineares e quadráticos) são considerados significados conforme apresentado na Tabela 10. O cálculo de ANOVA para $R_{m\acute{a}x}$ encontra-se na Tabela 11:

Tabela 10. Coeficientes de regressão para a variável resistência máxima à tração

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Média	121,9	0,06	2111,37	0,0000	121,65	122,15
CaCl ₂ (%) (L)	7,46	0,07	210,93	0,00002	14,61	15,22
CaCl ₂ (%) (Q)	4,46	0,08	105,89	0,00009	8,55	9,27
OE cravo (%) (L)	1,52	0,07	43,08	0,0005	2,74	3,35
OE cravo (%) (Q)	1,66	0,08	39,35	0,0006	2,95	3,67
CaCl ₂ xOE cravo	0,53	0,10	10,50	0,009	0,62	1,48

Tabela 11. ANOVA para a resistência máxima à tração

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	444,93	1	444,93	44493,27	0,00002
CaCl ₂ (%) (Q)	112,14	1	112,14	11214,02	0,00009
OE cravo (%) (L)	18,56	1	18,56	1856,01	0,0005
OE cravo (%) (Q)	15,49	1	15,49	1549,08	0,0006
CaCl ₂ xOE cravo	1,10	1	1,103	110,25	0,009
Lack of Fit	9,19	3	3,065	306,45	0,003
Erro puro	0,02	2	0,010		
Total	586,69	10			

$$R^2 = 0,98; F_{0,95; 5; 5} = 5,05; F\text{-calc} = 62,70$$

O modelo final com as variáveis codificadas que representa a resistência máxima à tração (MPa) em função da concentração de CaCl₂ e concentração de OE cravo na faixa estudada está apresentado na equação:

$$R_{\text{máx}} \text{ (MPa)} = 121,90 + 7,46[\text{CaCl}_2] + 4,46[\text{CaCl}_2]^2 + 1,52[\text{OEcravo}] + 1,66[\text{OEcravo}]^2 + 0,53[\text{CaCl}_2]x[\text{OEcravo}]$$

A partir do modelo apresentado, verificou-se que tanto a adição de CaCl₂ como a adição de OE cravo à formulação dos filmes provocou o aumento dos valores de resistência máxima à tração. No entanto, a adição de OE cravo não promoveu um aumento considerável, pois os valores de coeficientes são menores em relação aos coeficientes da variável CaCl₂. A representação gráfica para o modelo obtido encontra-se na Figura 16 e o gráfico de valores experimentais versus valores previstos, que representa o ajuste dos valores experimentais para os valores estabelecidos pelo modelo encontra-se na Figura 17.

Figura 16. Superfície de resposta para a resistência máxima à tração (MPa) em função da concentração de OE cravo (%) e concentração de CaCl₂ (%)

Figura 17. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a resposta resistência máxima à tração

O valor de F-calculado obtido a partir do modelo estudado foi 12,4 vezes superior ao valor de F-tabelado indicando que o modelo apresentado é significativo. O coeficiente de correlação R^2 (0,9843) sugere que o modelo ajustado é capaz de explicar 98,43% do total de variação existente no processo. O excelente ajuste do modelo também pode ser observado na Figura 17, no qual os pontos experimentais e os valores observados encontram-se muito próximos à reta de ajuste.

Para o cálculo do alongamento máximo na ruptura, tanto os termos quadráticos como os termos lineares foram significativos, como observado na Tabela 12. Os dados referentes à ANOVA para esta propriedade estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 12. Coeficientes de regressão para a variável alongamento máximo na ruptura

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Média	20,92	0,253	43,12	0,0005	9,83	12,01
CaCl ₂ (%) (L)	-10,98	0,310	-70,83	0,0002	-23,29	-20,63
CaCl ₂ (%) (Q)	5,36	0,369	29,05	0,001	9,13	12,31
OE cravo (%) (L)	2,69	0,310	17,38	0,003	4,05	6,72
OE cravo (%) (Q)	1,37	0,369	7,42	0,02	1,15	4,33
CaCl ₂ x OE cravo	-1,08	0,438	-4,94	0,04	-4,05	-0,28

Tabela 13. ANOVA para a variável alongamento máximo na ruptura

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	964,47	1	964,47	5017,20	0,0002
CaCl ₂ (%) (Q)	162,23	1	162,23	843,89	0,001
OE cravo (%) (L)	58,06	1	58,06	302,01	0,003
OE cravo (%) (Q)	10,59	1	10,59	55,12	0,02
CaCl ₂ x OE cravo	4,67	1	4,69	24,38	0,04
Lack of Fit	5,22	3	1,74	9,05	0,1
Erro puro	0,38	2	0,19		
Total	1195,31	10			

$$R^2 = 0,99; F_{0,95; 5; 5} = 5,05; F\text{-calc} = 212,44$$

O modelo final com as variáveis codificadas que representa o alongamento máximo na ruptura (%) em função da concentração de CaCl₂ e concentração de OE cravo na faixa estudada está apresentado na equação:

$$\text{Alongamento máximo na ruptura (\%)} = 20,92 - 10,98[\text{CaCl}_2] + 5,36[\text{CaCl}_2]^2 + 2,69[\text{OEcravo}] + 1,37[\text{OEcravo}]^2 - 1,08[\text{CaCl}_2] \times [\text{OEcravo}]$$

A representação gráfica do modelo para o alongamento máximo na ruptura encontra-se na Figura 18. Pela análise da superfície de resposta observa-se que os maiores valores de alongamento encontram-se nas faixas de menor concentração de CaCl_2 e maior concentração de OE cravo.

Figura 18. Superfície de resposta para o alongamento máximo na ruptura (%) em função da concentração de OE cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%)

O valor de F-calculado obtido a partir do modelo estudado foi 42 vezes superior ao valor de F-tabelado indicando que o modelo apresentado é altamente significativo, o que também é observado no gráfico de ajuste do modelo (Figura 19). O coeficiente de correlação R^2 (0,9953) sugere que o modelo ajustado é capaz de explicar 99,53% do total de variação existente no processo

Figura 19. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a resposta alongamento máximo na ruptura

Os dados referentes ao modelo para a resistência máxima à tração e alongamento máximo na ruptura foram validados considerando a mesma faixa de estudo apresentada para validar o modelo de permeabilidade ao vapor de água e os resultados encontram-se na Tabela 14 e Tabela 15, respectivamente.

Tabela 14. Valores da resistência máxima à tração ($R_{\text{máx}}$) experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	$R_{\text{máx}}$ experimental (MPa)	$R_{\text{máx}}$ previsto (MPa)	Desvio ($y-y'$) *	Desvio relativo $R_{\text{máx}}$ (%)
3 *	0,0316	0,884	123,74 ± 5,03	124,80	-1,06	-0,86
A	0,0316	1,0	122,42 ± 6,03	125,34	-2,92	-2,39
B	0,02	0,884	120,21 ± 4,74	124,70	-4,49	-3,74

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Tabela 15. Valores da porcentagem de alongamento na ruptura (AI %) experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	AI experimental (%)	AI previsto (%)	Desvio ($y-y'$) *	Desvio relativo AI (%)
3 *	0,0316	0,884	29,66 ± 2,17	24,00	5,66	19,02
A	0,0316	1,0	31,82 ± 2,02	24,60	7,22	22,69
B	0,02	0,884	32,69 ± 1,64	24,13	8,56	26,19

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Segundo relatado por Kalil *et al.* (2001), mesmo a análise estatística tendo sido realizada a $p < 0,05$ e a ANOVA sendo válida, com um alto coeficiente de correlação, a ocorrência de desvios de até 35% pode ser encontrado. Caso isto ocorra, é recomendada a validação do modelo em outra região de estudo.

De acordo com os desvios relativos observados para o modelo que representa a resistência máxima à tração e, o modelo que representa a porcentagem de alongamento na ruptura em função da concentração de CaCl_2 e OE cravo adicionada à formulação do filme, pode-se concluir que, de fato, estes modelos são significativos.

Os resultados obtidos estão coerentes ao relatado por Rhim (2004), no qual foi observado que a adição de CaCl_2 à formulação de filmes à base de alginato é capaz de provocar o aumento nos valores de resistência máxima à tração enquanto a porcentagem de alongamento na ruptura diminuiu, uma vez que a estrutura polimérica do filme perde flexibilidade pela formação de ligações cruzadas entre o alginato e o CaCl_2 .

5.3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS FILMES

Os valores da zona de inibição assim como a comparação entre os valores encontrados para as etapas antes e após a realização do *crosslinking* complementar com cloreto de cálcio, codificadas na tabela como etapa I e II, respectivamente, estão apresentados na Tabela 16.

O teste de Duncan, considerando o intervalo de confiança de 95%, foi realizado para a verificação da existência de diferenças significativas entre as duas etapas avaliadas. O teste foi realizado avaliando como resposta a zona de inibição encontrada por microrganismo para cada ensaio (ensaios de 1 a 11).

Foi verificado que somente *L. monocytogenes*, bactéria Gram-positiva, apresentou valores de zona de inibição (mm^2) para as duas condições avaliadas – antes e depois da etapa complementar de *crosslinking* – em todos os ensaios. Esse resultado já era esperado, pois o valor da CIM de OE cravo para esse microrganismo foi de 0,05% e o menor nível de concentração de OE cravo estudado no planejamento foi de 0,2%. O menor nível de concentração de OE

definido neste estudo considerou a CIM de OE cravo capaz de inibir todos os microrganismos avaliados.

Grande parte dos trabalhos que avaliaram o modo de ação de OE contra microrganismos patogênicos e deteriorantes verificou que, em geral, as bactérias Gram-positivas apresentam-se mais sensíveis quando comparadas às bactérias Gram-negativas (OUATTARA *et al.*, 1997; SMITH-PALMER, STEWART e FYFE, 1998; JULIANO, MATTANA e USAI, 2000; MARINO *et al.*, 2001; HARPAZ *et al.*, 2003). A menor susceptibilidade dos microrganismos Gram-negativos aos óleos essenciais está relacionada com a presença de uma membrana externa formada por uma dupla camada lipídica que dificulta a difusão dos compostos presentes no óleo essencial (BURT, 2004).

Quando os OE são incorporados às formulações de filmes, em geral, uma maior atividade antimicrobiana também é verificada contra bactérias Gram-positivas. Pranoto, Salokhe e Rakshit (2005) avaliaram quatro diferentes concentrações de OE alho (0,1%; 0,2%; 0,3% e 0,4%) adicionados a formulações de filmes à base de alginato e verificaram o aparecimento de zonas de inibição antimicrobiana somente para as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, enquanto que para *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, bactérias Gram-negativas, nenhuma zona de inibição foi observada independente da concentração de OE estudado.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos filmes avaliada pela medida da zona de inibição em mm² contra *L. monocytogenes*, *S. Give*, *S. Enteritidis*, *P. fluorescens* QaF01, *P. fluorescens* Lb03, *P. putida* Ia03, *P. putida* Kb04 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 para as etapas antes (I) e após o crosslinking complementar com cloreto de cálcio (II)

Ensaio	Microrganismos avaliados (Zona de inibição em mm ²)							
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. Give</i>		<i>S. Enteritidis</i>		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	
	I	II	I	II	I	II	I	II
1	11,91 ± 2,83 ^a	8,64 ± 0,00 ^a	0	0	0	0	0	0
2	11,91 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	8,65 ± 0,00 ^a	0
3	123,90 ± 18,70 ^a	64,40 ± 9,52 ^b	67,35 ± 14,62 ^a	39,53 ± 7,71 ^b	69,77 ± 4,87 ^a	37,50 ± 11,90 ^b	51,64 ± 12,58 ^a	28,60 ± 3,51 ^b
4	40,06 ± 16,32 ^a	33,44 ± 15,42 ^a	31,02 ± 11,22 ^a	15,31 ± 3,01 ^a	33,05 ± 9,94 ^a	15,32 ± 3,06 ^b	0	0
5	15,32 ± 6,80 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	0	0
6	24,67 ± 5,89 ^a	10,28 ± 2,83 ^b	20,75 ± 3,29 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	11,91 ± 2,83 ^b	0	0
7	10,28 ± 2,83 ^a	8,64 ± 0,00 ^a	0	0	0	0	0	0
8	97,19 ± 19,53 ^a	42,22 ± 14,81 ^b	59,04 ± 7,85 ^a	32,79 ± 3,74 ^b	61,59 ± 4,65 ^a	36,08 ± 5,01 ^b	41,69 ± 3,97 ^a	26,70 ± 6,80 ^b
9	26,57 ± 3,51 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	22,65 ± 3,29 ^a	15,32 ± 3,06 ^b	20,75 ± 3,29 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a
10	25,57 ± 3,51 ^a	22,65 ± 3,29 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	17,08 ± 3,06 ^a	18,85 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	13,68 ± 5,11 ^a	10,28 ± 2,83 ^a
11	22,65 ± 3,29 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	17,08 ± 3,06 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	17,08 ± 3,06 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	8,64 ± 0,00 ^b

Ensaio	Microrganismos avaliados (Zona de inibição em mm ²)							
	<i>P. fluorescens</i> QaF01		<i>P. fluorescens</i> Lb03		<i>P. putida</i> Kb04		<i>P. putida</i> Ia03	
	I	II	I	II	I	II	I	II
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	8,64 ± 0,00 ^a	0 ^b	8,64 ± 0,00 ^a	0 ^b	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b
3	67,09 ± 8,25 ^a	39,53 ± 7,71 ^b	69,77 ± 4,87 ^a	32,79 ± 3,74 ^b	69,77 ± 4,87 ^a	41,69 ± 3,97 ^b	69,77 ± 4,87 ^a	41,69 ± 3,97 ^b
4	28,73 ± 7,26 ^a	15,31 ± 3,06 ^b	26,57 ± 3,51 ^a	13,68 ± 5,11 ^b	26,83 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	26,83 ± 9,34 ^a	15,32 ± 3,06 ^a
5	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	8,64 ± 0,00 ^a	0	8,65 ± 0,00 ^a	0 ^b	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b
6	18,85 ± 0,00 ^a	10,28 ± 2,83 ^b	18,85 ± 0,00 ^a	11,91 ± 2,83 ^b	20,75 ± 3,29 ^a	10,28 ± 2,83 ^b	17,08 ± 3,06 ^a	10,28 ± 2,83 ^b
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	96,67 ± 5,55 ^a	18,85 ± 0,00 ^b	87,32 ± 5,33 ^a	20,75 ± 0,00 ^b	72,85 ± 12,86 ^a	22,65 ± 3,29 ^b	69,77 ± 10,43 ^a	22,65 ± 3,29 ^b
9	22,65 ± 3,29 ^a	15,32 ± 3,06 ^b	20,75 ± 3,29 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	13,68 ± 5,11 ^a	22,65 ± 3,29 ^a	13,68 ± 5,11 ^b
10	18,85 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	18,85 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	18,85 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	18,85 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a
11	18,85 ± 0,00 ^a	17,08 ± 3,06 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	13,68 ± 5,11 ^a	18,85 ± 0,00 ^a	15,32 ± 3,06 ^a	20,75 ± 3,29 ^a	15,32 ± 3,06 ^a

Média ± desvio padrão (n=5) na mesma linha seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Tabela 17. Comparação dos valores de zona de inibição (mm²) encontrados para os diferentes microrganismos avaliados em cada ensaio considerando apenas a etapa pós-*crosslinking* complementar com cloreto de cálcio

Ensaio	Microrganismos avaliados (Zona de inibição em mm ²)							
	L. monocytogenes	S. Give	S. Enteritidis	P. aeruginosa ATCC27853	P. fluorescens QaF01	P. fluorescens Lb03	P. putida Kb04	P. putida Ia03
	II	II	II	II	II	II	II	II
1	8,64 ± 0,00 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
2	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
3	64,40 ± 9,52 ^a	39,53 ± 7,71 ^b	37,50 ± 11,90 ^b	28,60 ± 3,51 ^b	39,53 ± 7,71 ^b	32,79 ± 3,74 ^b	41,69 ± 3,97 ^b	41,69 ± 3,97 ^b
4	33,44 ± 15,42 ^a	15,31 ± 3,01 ^b	15,32 ± 3,06 ^b	0 ^c	15,31 ± 3,06 ^b	13,68 ± 5,11 ^b	15,32 ± 3,06 ^b	15,32 ± 3,06 ^b
5	10,28 ± 2,83 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
6	10,28 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	11,91 ± 2,83 ^a	0 ^b	10,28 ± 2,83 ^a	11,91 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a	10,28 ± 2,83 ^a
7	8,64 ± 0,00 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
8	42,22 ± 14,81 ^a	32,79 ± 3,74 ^{a,b}	36,08 ± 5,01 ^{a,b}	26,70 ± 6,80 ^{b,c}	18,85 ± 0,00 ^d	20,75 ± 0,00 ^{c,d}	22,65 ± 3,29 ^{c,d}	22,65 ± 3,29 ^{c,d}
9	20,75 ± 3,29 ^a	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	10,28 ± 2,83 ^b	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	13,68 ± 5,11 ^b	13,68 ± 5,11 ^b
10	22,65 ± 3,29 ^a	17,08 ± 3,06 ^a	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	10,28 ± 2,83 ^b	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	15,32 ± 3,06 ^{a,b}	15,32 ± 3,06 ^{a,b}
11	20,75 ± 3,29 ^{a,b}	17,08 ± 3,06 ^{a,b}	17,08 ± 3,06 ^{a,b}	8,64 ± 0,00 ^c	17,08 ± 3,06 ^{a,b}	13,68 ± 5,11 ^b	15,32 ± 3,06 ^b	15,32 ± 3,06 ^b

Média ± desvio padrão (n=5) na mesma linha seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

Em geral, observou-se uma redução na atividade antimicrobiana dos filmes após a realização da etapa complementar de *crosslinking* com CaCl_2 . Esta condição é verificada pelos menores valores de zona de inibição (mm^2) apresentados na Tabela 16 (coluna II), sendo que para a maioria dos ensaios avaliados os resultados obtidos na condição II foram significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparados à condição I.

Para as formulações correspondentes aos ensaios 1 ($\text{CaCl}_2 = 0,0316\%$ e OE cravo = $0,316\%$) e 7 ($\text{CaCl}_2 = 0,06\%$ e OE cravo = $0,2\%$) foi observada ausência de zonas de inibição antimicrobiana para os ensaios envolvendo as bactérias Gram-negativas (*S. Give*, *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. fluorescens* QaF01, *P. fluorescens* Lb03, *P. putida* Kb04 e *P. putida* Ia03) nas duas condições avaliadas. Já para as formulações relacionadas aos ensaios 2 ($\text{CaCl}_2 = 0,0884\%$ e OE cravo = $0,316\%$) e 5 ($\text{CaCl}_2 = 0,02\%$ e OE cravo = $0,6\%$), observou-se a perda do efeito antimicrobiano após a etapa de *crosslinking* complementar com CaCl_2 , com exceção de *P. aeruginosa* ATCC 27853 onde a ausência de zonas de inibição proporcionadas para esse microrganismo também foi observada nos ensaios 1, 4, 5, 6 e 7 para as duas condições avaliadas.

Estes resultados sugerem que para os menores níveis de OE cravo estudados ($0,2\%$ e $0,316\%$), a adição de diferentes concentrações de CaCl_2 não foi suficiente para a manutenção da atividade antimicrobiana após a etapa de *crosslinking* complementar com CaCl_2 .

Os maiores valores de zona de inibição foram observados para os ensaios 3 ($\text{CaCl}_2 = 0,0316\%$ e OE cravo = $0,884\%$) e 8 ($\text{CaCl}_2 = 0,06\%$ e OE cravo = $1,0\%$) para a condição I. Após a etapa de *crosslinking* complementar com CaCl_2 , observou-se para esses ensaios uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de zona de inibição para todos os microrganismos avaliados. No entanto, apesar do ensaio 8 avaliar uma maior concentração de OE cravo ($1,0\%$) comparado ao ensaio 3 ($0,884\%$), este apresentou resultados superiores de zona de inibição antimicrobiana. Neste caso, o aumento da concentração de CaCl_2 para valores acima de $0,0316\%$ pode ter ocasionado o aumento do efeito de *crosslinking* primário, ou seja, a formação

de um gel muito forte pode ter dificultado a incorporação da emulsão de OE na matriz polimérica dos filmes sendo a porção não incorporada solubilizada após a etapa de *crosslinking* complementar. A solubilização dos agentes ativos presentes no OE cravo durante a etapa de *crosslinking* complementar pode estar relacionada à diminuição do efeito antimicrobiano do filme.

Sabendo que a etapa complementar de *crosslinking* com CaCl_2 é necessária para a manutenção da integridade do filme quando este for aplicado em alimento, os valores de zona de inibição foram comparados avaliando somente a condição II apresentada na Tabela 17. Verifica-se que para todos os ensaios avaliados, a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* apresentou valores de zona de inibição significativamente superiores ($p < 0,05$) aos demais microrganismos avaliados. Os menores valores de zona de inibição encontrados foram para *P. aeruginosa* ATCC 27853.

A Tabela 18 apresenta um resumo dos principais fatores avaliados: equação modelo, coeficiente de correlação (R^2), F-calculado e F-tabelado. Os modelos apresentados para a zona de inibição antimicrobiana referem-se apenas à condição na qual foi realizada a etapa complementar de *crosslinking*, uma vez que etapa é necessária para a manutenção da integridade do filme quando este for aplicado em alimento.

Tabela 18. Modelo final para a zona de inibição (ZI) em mm² por microrganismo avaliado em função da concentração de cloreto de cálcio e concentração de óleo essencial de cravo adicionada na formulação do filme de alginato, considerando apenas a etapa pós-crosslinking complementar

Microrganismo	Modelo para a zona de inibição (ZI) em mm ²	R ²	F _{calc}	F _{tab}
<i>L. monocytogenes</i>	ZI = 21,38 - 3,66CaCl ₂ - 2,72CaCl ₂ ² + 15,80OE + + 4,85OE ² - 8,15CaCl ₂ xOE	0,85	5,33	3,45
<i>S. Give</i>	ZI = 16,49 - 1,21CaCl ₂ - 4,94CaCl ₂ ² + 12,65OE - - 12,65CaCl ₂ xOE	0,88	10,99	3,18
<i>S. Enteritidis</i>	ZI = 15,90 - 4,67CaCl ₂ ² + 12,98OE + 1,37OE ² - - 5,55CaCl ₂ xOE	0,89	12,35	3,18
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	ZI = 9,73 - 3,58CaCl ₂ - 4,75CaCl ₂ ² + 8,29OE + + 1,93OE ² - 7,15CaCl ₂ xOE	0,90	9,16	3,45
<i>P. fluorescens</i> QaF01	ZI = 15,91 - 1,21CaCl ₂ - 3,78CaCl ₂ ² + 10,19OE - - 1,63OE ² - 9,14CaCl ₂ xOE	0,74	2,88	3,45
<i>P. fluorescens</i> Lb03	ZI = 14,77 - 3,55CaCl ₂ ² + 9,48OE - 1,34OE ² - - 4,78CaCl ₂ xOE	0,80	5,89	3,18
<i>P. putida</i> Kb04	ZI = 14,77 - 1,48CaCl ₂ - 3,31CaCl ₂ ² + 11,13OE - - 6,59CaCl ₂ xOE	0,78	5,17	3,18
<i>P. putida</i> Ia03	ZI = 14,77 - 1,48CaCl ₂ - 3,31CaCl ₂ ² + 11,13OE - - 6,59CaCl ₂ xOE	0,78	5,17	3,18

p<0,10

Para a construção dos modelos, foi adotado o nível de significância de 10% (p<0,10). De acordo com Kalil *et al.* (2001), em trabalhos onde a variável resposta envolve microrganismos, a utilização de um nível de significância maior pode justificar de maneira mais adequada as variações existentes no processo estudado. De fato, como o relatado por Mann e Markham (1998), métodos de determinação da atividade antimicrobiana pela difusão de óleo essencial em meio de cultura (ágar) pode ser dificultado pela não afinidade das partículas oleosas com a água presente no ágar.

Os gráficos de valores experimentais versus valores previstos para os modelos apresentados na Tabela 18 encontram-se no ANEXO 2 e a representação gráfica das equações obtidas pode ser visualizada nas curvas de contorno apresentadas na Figura 20 e Figura 21.

Todos os modelos que representam a atividade antimicrobiana através da zona de inibição por microrganismo avaliado apresentam pelo menos um dos fatores (concentração de CaCl₂ e/ou concentração de OE cravo) como termo quadrático significativo (p<0,10), justificando, portanto, a escolha do planejamento central composto rotacional como modelo quadrático para o sistema estudado.

Os termos que não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,10$) foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA e obtenção dos valores de R^2 e F-calculado e não foram adicionados à equação modelo.

Em geral, verificou-se que os termos relacionados à concentração de CaCl_2 apresentaram coeficientes negativos, enquanto que os termos relacionados à concentração de OE cravo apresentaram coeficientes positivos. Isso significa que quando avaliado individualmente, altas concentrações de CaCl_2 adicionado à formulação do filme pode proporcionar um efeito negativo para a zona de inibição antimicrobiana, enquanto altas concentrações de OE cravo potencializam a ação antimicrobiana. No entanto, o efeito significativo ($p < 0,10$) entre a interação $\text{CaCl}_2 \times \text{OE cravo}$ demonstra que existe um efeito sinérgico entre esses dois fatores, ou seja, a combinação adequada desses dois ingredientes é capaz de potencializar a ação antimicrobiana, conferindo o aumento dos valores de zona de inibição antimicrobiana.

A análise das curvas de contorno permite a definição das concentrações mais adequadas de CaCl_2 e OE cravo que maximizam os valores de zona de inibição. Observa-se na Figura 20 e Figura 21, que para todos os microrganismos avaliados, os maiores valores de zona de inibição antimicrobianas são encontrados para uma concentração mínima de aproximadamente 0,8% de OE cravo e uma concentração máxima de aproximadamente 0,05% de CaCl_2 .

Considerando bons modelos apenas valores de R^2 entre 0,85 e 0,90 (MYERS e MONTGOMERY, 2002), os melhores modelos encontrados foram os que descrevem a zona de inibição antimicrobiana para *L. monocytogenes*, *S. Give*, *S. Enteritidis* e *P. aeruginosa* ATCC 27853. O valor de F-calculado maior que o valor de F-tabelado é indicativo de que o modelo apresentado para esses microrganismos também é significativo.

Já os valores de $R^2 < 0,80$ sugerem um baixo ajuste do modelo para a zona de inibição avaliada contra *P. fluorescens* (QaF01 e Lb03) e *P. putida* (Kb04 e Ia03). O baixo grau de correlação observado pode estar relacionado

com a variabilidade existente no processo de difusão dos agentes antimicrobianos presentes no OE cravo pela superfície do meio de cultura. Apesar de cinco amostras de cada ensaio terem sido analisadas para a determinação da zona de inibição a variabilidade dos valores encontrados no ponto central pode não ter sido suficiente para a obtenção de um ajuste adequado ao modelo. Os valores referentes à validação dos modelos encontram-se nas tabelas apresentadas no ANEXO 2, no qual foi observado que os maiores desvios relativos estão relacionados aos modelos que apresentaram menores valores para o coeficiente de correlação.

Figura 20. Curvas de contorno relativas à zona de inibição (mm²) contra: (A) *L. monocytogenes*, (B) *S. Give*, (C) *S. Enteritidis* e (D) *P. aeruginosa* resultante da variação da concentração de óleo essencial de cravo (%) e concentração de CaCl₂ (%)

Figura 21. Curvas de contorno relativas à zona de inibição (mm^2) contra: (E) *P. fluorescens* QaF01, (F) *P. fluorescens* Lb03, (G) *P. putida* Kb04 e (H) *P. putida* Ia03 resultante da variação da concentração de óleo essencial de cravo (%) e concentração de CaCl_2 (%)

5.3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM CARNE DE FRANGO

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em carne de frango foi realizada somente com a formulação referente ao ensaio 3 com realização da etapa de *crosslinking* complementar ($\text{CaCl}_2=0,0316\%$ e OE cravo= $0,884\%$). Esta formulação foi escolhida por apresentar os maiores valores de zona de inibição avaliados *in vitro*, conforme observado na Tabela 17. Os resultados referentes à enumeração de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. no primeiro dia de análise (No) e após 5 dias de armazenamento a 7º C (Nf) estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Análise microbiológica dos ensaios em amostras de peito de frango

Microrganismo	Condição	No ^(a) (log UFC/g)	Nf ^(b) (log UFC/g)
<i>Salmonella</i> spp	C ^(c)	< 1	< 1
	C _{mo} ^(d)	3,2 ± 0,18 ^a	3,5 ± 0,26 ^a
	Filme ^(e)	< 1	< 1
	Filme _{mo} ^(f)	3,1 ± 0,22 ^a	3,1 ± 0,23 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	C	< 1	< 1
	C _{mo}	3,3 ± 0,15 ^b	4,7 ± 0,21 ^a
	Filme	< 1	< 1
	Filme _{mo}	3,3 ± 0,18 ^a	3,6 ± 0,18 ^a
<i>Pseudomonas</i> spp	C	< 1	<1
	C _{mo}	3,6 ± 0,21 ^b	7,0 ± 0,19 ^a
	Filme	< 1	<1
	Filme _{mo}	3,4 ± 0,20 ^b	6,8 ± 0,16 ^a
Mesófilos aeróbios	Frango refrigerado*	3,2 ± 0,22 ^b	6,8 ± 0,21 ^a
	Frango irradiado*	<1	<1
Psicrotróficos aeróbios	Frango refrigerado	3,8 ± 0,16 ^b	8,2 ± 0,29 ^a
	Frango irradiado	<1	<1

Média ± desvio padrão (n=3) na mesma linha seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si para o nível de significância de 5%.

(a) Média de 3 repetições para o ensaio inicial - No

(b) Média de 3 repetições após 5 dias de armazenamento a 7º C - Nf

(c) Amostra de frango sem o microrganismo e sem o filme

(d) Amostra de frango com o microrganismo e sem o filme

(e) Amostra de frango sem o microrganismo e com o filme

(f) Amostra de frango com o microrganismo e com o filme

* Controle da matéria-prima

Foi observada a ausência de multiplicação de *Salmonella* spp. nas amostras controle e sem inóculo. Para *L. monocytogenes*, a população

manteve-se constante apenas na amostra onde a cobertura com filme foi utilizada, enquanto que na amostra controle, houve um aumento significativo ($p>0,05$) de 1,34 log UFC/g após o período final de armazenagem.

Já para *Pseudomonas* spp., tanto a amostra controle como a amostra com filme antimicrobiano, apresentaram um aumento significativo ($p>0,05$) de 3,42 log UFC/g e 3,27 log UFC/g, respectivamente.

Para as amostras onde não houve a contaminação com o “pool” de *Salmonella* e *L. monocytogenes*, esses microrganismos não foram detectados pelo método utilizado. Caso estivessem presentes e em níveis em que fosse possível a realização de enumeração, os valores obtidos seriam descontados dos valores iniciais e finais de enumeração.

Para a análise de *Pseudomonas* spp., as amostras controle irradiadas não apresentaram valores de contagem para o dia inicial e final de análise, pela metodologia empregada. Estes dados são similares aos relatados por Miyagusku *et al.* (2003) que avaliaram diferentes doses de irradiação sobre a microbiota de peito de frango refrigerado e observaram que com doses de 1,5 a 3,0 kGy somente foi observado valores de contagem após 15 dias de armazenagem a 4° C.

Em geral, a utilização do filme adicionado de OE de cravo como embalagem primária promoveu o controle na multiplicação de *L. monocytogenes* em amostras de carne de frango, uma vez que a amostra controle apresentou um aumento significativo de 1,34 log UFC/g na população enquanto na amostra na qual a cobertura com filme comestível foi utilizada ela se manteve constante. Este resultado é considerado importante, pois em alimentos com atividade de água e valores de pH adequados à multiplicação desse patógeno (tais como a carne de frango) e armazenados sob refrigeração, a temperatura é capaz de selecionar a microbiota presente no alimento, favorecendo a multiplicação de microrganismos psicrótrófos, como *L. monocytogenes* (FARBER e PETERKIN, 1991). Embora a carne de frango sofra um tratamento térmico antes do consumo e *L. monocytogenes* seja destruída pelo aquecimento adequado, a manipulação do produto *in*

natura pode ser uma importante fonte de contaminação cruzada desse patógeno para alimentos prontos para o consumo (HUSS, JORGENSEN, VOGEL, 2000).

Para *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp., no entanto, a utilização do filme como embalagem antimicrobiana não mostrou a mesma eficiência.

5.3.7 ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)

Os valores para a atividade de água dos filmes variaram de 0,52 a 0,60 para os ensaios referentes a etapa que não envolvia o *crosslinking* complementar e, 0,45 a 0,48 para os ensaios que envolveram esta etapa.

Foi observado que após ser aplicado na carne de frango e decorridos os 5 dias de armazenagem a 7° C, o filme apresentou um aumento na atividade de água de aproximadamente 0,47 para 0,76. Embora tenha provocado o aumento no intumescimento da estrutura do filme, este não prejudicou a visibilidade do produto, o que pode ser observado na Figura 22.

Figura 22. Amostra de peito de frango embalada por 5 dias a 7° C com o filme antimicrobiano

Observou-se também que os ensaios-controle, no qual os filmes não foram utilizados, ocorreu o exsudamento de água pelo frango na embalagem (Figura 23-A), enquanto nos ensaios no qual o filme antimicrobiano foi utilizado como embalagem primária, este fato não foi observado (Figura 23-B).

Figura 23. Amostras de peito de frango após 5 dias de armazenamento a 7° C: (A) sem aplicação do filme antimicrobiano – exsudamento de água pelo frango e, (B) com aplicação do filme antimicrobiano

Para a análise dos valores de atividade de água dos filmes, não foi possível realizar a avaliação dos resultados através da análise de superfície de resposta uma vez que os valores obtidos entre os diferentes ensaios definidos pelo planejamento experimental foram muito próximos.

5.3.8 ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados referentes à opinião de 50 provadores encontram-se na Figura 18.

Figura 24. Aceitabilidade das amostras de peito de frango *in natura* com relação ao aroma.

Considerando que a escala hedônica varia de 1 a 9, a nota média atribuída para o produto com relação ao aroma foi de 5,3, tanto para a amostra padrão como para a amostra na qual o filme adicionado de OE de cravo foi utilizado.

Esse resultado sugere que não houve uma preferência significativa ($p < 0,05$) independente da amostra avaliada pelo provador, uma vez que a mesma média global foi obtida para as duas amostras.

Considerando apenas a aceitabilidade das amostras, os resultados apresentados na Figura 24 mostram que 56% (28) dos provadores gostaram do aroma das amostras na qual foi utilizada como embalagem primária a cobertura de filme comestível adicionada de OE de cravo, variando a opinião entre “gostei ligeiramente” e “gostei extremamente”. Com relação à amostra padrão, houve uma aceitabilidade de 40% (20).

Dos 56% (28) de provadores que gostaram da amostra com filme, 32% (9) relataram nos comentários que gostaram desta amostra apenas pelo aroma agradável de “tempero”. No entanto, 10,7% (3) dos provadores comentaram que apesar de terem gostado mais da amostra com filme, ficam receosos com o sabor do produto após o processamento.

Com relação à rejeição das amostras, 38% (19) dos provadores

rejeitaram a amostra na qual o filme adicionado de OE de cravo foi utilizado, porém 32% (16) dos provadores também rejeitaram a amostra padrão, variando a opinião entre “desgostei ligeiramente” e “desgostei extremamente”.

Observou-se que dos 38% (19) dos provadores que rejeitaram a amostra com filme, 58% (11) relataram nos comentários que estranhariam a compra de um frango *in natura* com aroma de cravo, pois o mesmo mascara o aroma original do produto. Outros 10,5% (2) dos provadores relataram que rejeitaram a amostra com filme por não apreciarem o aroma de cravo.

6 CONCLUSÃO

Baseado nas condições desta pesquisa e nos resultados e discussão apresentados, pode-se concluir que:

- O filme à base de alginato incorporado de óleo essencial de cravo (0,884%) e CaCl_2 (0,0316%) utilizado como embalagem primária em pedaços de peito de frango foi eficiente no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* mas não no de *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp.
- A incorporação de 0,884% de OE ao filme não alterou significativamente o aroma de pedaços de peito de frango *in natura*.
- O uso do filme à base de alginato incorporado de OE cravo mostrou ser viável. Porém, poderá sofrer interferência da matriz alimentar caso esta matriz apresente exsudação.

7 REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. D882-00: **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. Philadelphia, 2001.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. E96-00: **Standard test methods of water vapor transmission of materials**. Philadelphia, 2000.

ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. In: DOWNERS, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, cap.37, p.357-380, 2001

ARNAUT-ROLLIER, I.; ZUTTER, L.; VAN HOOF, J. Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v.48 p.87-96, 1999.

ASLAM, M.; SERVICE, C. Genetic characterization of spoilage pseudomonads isolated from retail-displayed beef. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, p.153-157, 2008.

Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. **Exportação mundial de carne de frango – principais países período de 2000 a 2007**. Disponível em: http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=74. Acesso em: 18 de novembro de 2008.

BEVERLYA, R.L.; JANESA, M.E.; PRINYAWIWATKULAA, W.; NOB, H.K. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v.25, p.534-537, 2008.

BRACCINI, I; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca²⁺ - induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model. **Biomacromolecules**, v.2, p.1089-1096, 2001.

BRAVIN, B.; PERESSINI, D.; SENSIDONI, A. Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf life of dry bakery products. **Journal of Food Engineering**, v.76, p.280-290, 2006.

BURT, S.A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.162-167, 2003.

CHA, D.S.; CHINNAN, M.S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.223-237, 2004.

CHA, D.S.; CHOI, J.H.; CHINNAN, M.S.; PARK, H.J. Antimicrobial films based on Na-alginate and k-carrageenan. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.35, p.715-719, 2002.

CHAND, S.; LUZUNZI, I.; VEAL, D.A.; WILLIAMS, L.R.; KARUSO, P. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **Journal of Antibiotics**, v.47, p.1295-1304, 1994.

CHIARINI, E. ***Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação**. São Paulo, 2007. 140p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

CEYLAN, E.; FUNG, D.Y.C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.12, n.1, p.1-55, 2004.

CI, S.X.; HUYNH, T.H.; LOUIE, L.W.; YANG, A.; BEALS, B.J.; RON, N.; TSANG, W.; SOON-SHIONG, P.; DESAI, N.P. Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion. **Journal of Chromatography**, v.864, n.2, p.199-210, 1999.

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, v.49, p.429-434, 1984.

COUSIN, M.A.; JAY, J.M.; VASAVADA, P.C. In: DOWNERS, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, cap.13, p.159-164, 2001.

DATTA, S.; JANES, M.E.; XUE, Q.G.; LOSSO, J.; LA PEYRE, J.F. Control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Anatum on the surface of smoked salmon coated with calcium alginate coating containing oyster lysozyme and nisin. **Journal of Food Science**, v.73, n.2, p.M67-M71, 2008.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.A.; VOILLEY, A. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packaging: a Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.4, p.299-313, 1998.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella* typhi by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.107-115, 2010.

DIAS, D.A.M. **Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro localizado no**

Estado de São Paulo. São Paulo, 2008. 66p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

DU, W.X.; OLSEN, C.W.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; MCHUGH, T.H.; LEVIN, C.E.; FRIEDMAN, M. Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.3082-3088, 2008.

ERTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.85-91, 1998.

FAN, Y.; XUA, Y.; WANG, D; SUN, L.Z.J.; SUN, L; ZHANG, B. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality. **Postharvest Biology and Technology**, v.53, n. 1-2, p. 84-90, 2009.

FDA. **Guidance for industry: use of recycled plastics in food packaging: chemistry considerations.** 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm120762.htm>. Acesso em: 20 de Novembro de 2009.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiology Review**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v.10, p.1232-1240, 2006.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v.8, p.161-182, 1988.

GIL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.1, p.1-9, 2006.

GRANT, G.T.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; SMITH, P.J.C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, v.32, n.1, p.195-198, 1973.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asia sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.307-312, 2003.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential

oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, n.86, p.985-990, 1999.

HERISKAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R. V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology Infection**, v.129, p.1-8, 2002.

HITCHINS, A.D. *Listeria monocytogenes*. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2003. Cap. 10. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071400>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2010.

HILTON JR., A.; CASON, J.A.; INGRAM, K. D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.155-165, 2004.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress response and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.6, p.504-509, 2004.

HUSS, H. H.; JORGENSEN, L. V.; VOGEL, B. F. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.3, p.267-274, 2000.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6th ed. Kluwer Academic Publishers, New York, 2000.

JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; LONERGAN, G. Biodegradability of selected range of polymers and polymer blends and standard methods for assessment of biodegradation. **Journal of Polymer and the Environment**, v.13, n.03, p.231-251, 2005.

JULIANO, C.; MATTANA, A.; USAI, M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, p.516-522, 2000.

KALIL, S.J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.94, p.257-264, 2001.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, v.40, n.12, p.47-59, 1986.

LU F.; LIU D.H.; YE X.Q; WEI, Y.; LIU, F. Alginate-calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4° C. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, n.5, p.848-854, 2009

MAFTOONAZAD, N.; RAMASWAMY, H.S.; MARCOTTE, M. Shelf-life extension

of peaches through sodium alginate and methyl cellulose edible coatings. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.951-957, 2008.

MAIZURA, M.; FAZILAH, A.; NORZIAH, M.H.; KARIM, A.A. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago-starch-alginate edible film containing lemongrass oil. **Journal of Food Science**, v.72, n.6, 2007.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.3, p.538-544, 1998.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Laminacea* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.187-195, 2001.

MEHYAR, G.F.; HAN, J. H.; HOLLEY, R.A.; BLANK, G.; HYDAMAKA, A. Suitability of pea starch and calcium alginate as antimicrobial coatings on chicken skin. **Poultry Science**, v.86, n.2, p.386-393, 2007.

MILLETTE, M.; TIEN, C.L.; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. **Food Control**, v.18, p.878-884, 2007.

MORTON, R.D. In: DOWNERS, F.P.; ITO, K., eds. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, cap.7, p.63-67, 2001.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. New York: John Wiley and Sons, p.798, 2002.

NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION. **Purity gum Be – Technical Service Bulletin**. Disponível em: <http://eu.foodinnovation.com/docs/PGUMBE.pdf>. Acesso em: 24 de Novembro de 2009.

OLIVAS, G.I.; MATTINSON, D.S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Alginate coatings for preservation of minimally processed 'Gala' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.45, n.1, p.89-96, 2007.

OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. **Postharvest Biology and Technology**, v.50, p.87-94, 2008.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.155-162,

1997.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of alginate based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, p.2364-2369, 2006a.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**, v.20, n.4, p.961-908, 2007b.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v.73, p.236-244, 2006b.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-420, 2007a.

PAVLATH, A.E.; GOSSETT, C.; CAMIRAND, W.; ROBERTSON, G.H. Ionomeric Films of Alginic Acid. **Journal of Food Science**, v.64, n.1, 1999.

PRANOTO, Y.; SALOKHE, V.M.; RAKSHIT, S. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, v.38, p.267-272, 2005.

QIN, Y. Review – Alginate fibers: an overview of the production processes and applications in wound management. **Polymer International**, v.57, p.171-180, 2008.

RAYUBAUDI-MASSILIA, R.M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.313-327, 2008.

RAYUBAUDI-MASSILIA, R. M.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. **Journal of Food Protection**, v.71, n.6, p.1150-1161, 2008.

RHIM, J.W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, p.323-330, 2004.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PAN, Z.; McHUGH, T.H. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial

properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.634-641, 2007a.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; RAYBAUDI-MASSILIA, R.M.; SOLIVA-FORTUNY R.C.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; McHUGH, T.H; MARTÍN-BELLOSO, O. Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, v.45, n.2, p.254-264, 2007b.

ROOPA, B.S.; BHATTACHARYA, S. Alginate gels: I. Characterization of textural attributes. **Journal of Food Engineering**, v.85, p.123-131, 2008.

ROOPA, B.S.; BHATTACHARYA, S. Alginate gels: Rupture characteristics as a function of the conditions of gel formation. **Journal of Food Engineering**, v.91, p.448-454, 2009.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.10205-10214, 2006.

SCHMOLKA, I.R. The synergistic effects of nonionic surfactants upon cationic germicidal agents. **Journal of Society of Chemistry**, n.24, p.577-592, 1973.

SEBTI, I.; CHOLLET, E.; DEGRAEVE, P.; NOEL, C.; PEYROL, E. Water Sensitivity, Antimicrobial, and Physicochemical Analyses of Edible Films Based on HPMC and/or Chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.693-399, 2007.

SEYDIM, A.C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v.39, n.5, p.639-644, 2006.

SHAW, B.G.; LATTY, J.B. A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. **Journal of Applied Bacteriology**, v.52, p.219-228, 1982.

SIEW, C. K.; WILLIAMS, P. A. New insights into the mechanism of gelation of alginate and pectin: charge annihilation and reversal mechanism. **Biomacromolecules**, v.6, p.963-969, 2005.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.11, p.8022-8028, 1994.

SILVA, M.A; BIERHALZ, A.C.K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.736-742, 2009.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Food Microbiology**, v.29, p.118-122, 1998.

SUNDHEIM G.; SLETTEN, A.; DAINITY, R.H. Identification of *Pseudomonas* from fresh and chill-stored chicken carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.185-194, 1998.

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

TAPIA, M.S.; ROJAS-GRAÜ, M.A.; CARMONA, A.; RODRIGUEZ, F.J.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.1493-1503, 2008.

TASSOU, C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° C and 10° C. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.593-600, 1995.

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, n.2, p.M39-M44, 2006.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G.J.E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5° C. **Journal of Applied Microbiology**, v.29, p.901-909, 2000.

TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhi. **Food Control**, n.20, p.1073-1079, 2009.

ZACTITI, E.M.; KIECKBUSCH, T. Potassium sorbate in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. **Journal of Food Engineering**, v.77, p.462-467, 2006.

ZHAO, T.; DOYLE, M. P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.3996-4003, 2004.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1

Exame de morfologia por coloração de Gram

A partir do crescimento obtido em ágar nutriente (4.2.1.2) foi preparado um esfregaço em lâmina de microscopia misturando uma alíquota da cultura de crescimento com uma gota de solução salina estéril 0,85%. Após a fixação pelo calor foi realizada a etapa de coloração de Gram no qual o esfregaço foi corado com solução de cristal violeta fenicada por 1 min, seguida de recobrimento com solução de lugol por mais 1 min, enxágüe em água corrente, aplicação de álcool etílico 95°, lavagem em água corrente, aplicação de fucsina e lavagem e secagem do esfregaço seguida de observação em microscópio óptico (Olympus) com aumento de 1000 X. Foram consideradas positivas as colônias que apresentaram o formato de bacilos Gram negativos.

Avaliação da produção de oxidase

Uma porção do crescimento obtido em ágar nutriente (4.2.1.2) foi aplicada, com auxílio de alça bacteriológica descartável, em tiras de papel filtro estéreis umedecidas com o reagente de Oxidase (N, N, N', N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine-2HCl, Remel, BactiDrop Oxidase, ref. R21540). O aparecimento de coloração azul escuro dentro de 10 segundos é indicativo de resultado positivo.

Avaliação da produção de catalase

O teste de produção de catalase foi realizado em lâmina de vidro misturando uma porção do crescimento obtido em ágar nutriente (4.2.1.2) com aproximadamente 50 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Sigma-Aldrich, ref. 323381). A decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase é verificada através da produção de bolhas, indicando resultado positivo.

Avaliação da utilização da glicose em aerobiose e anaerobiose

Para a avaliação da utilização da glicose em aerobiose e anaerobiose, uma porção do crescimento obtido em ágar nutriente (4.2.1.2) foi inoculado em tubos contendo o meio de cultura OF adicionado de glicose. Para realização do teste, foi utilizado o meio de cultura OF (OF Basal Medium, Merck), onde para cada litro de meio de cultura adicionava-se 100 mL de solução D-glicose (Synth) a 10% esterilizada por filtração. 5 mL da solução final foi porcionada em tubos estéreis com adição de 1 mL de óleo de parafina estéril para os ensaios em anaerobiose. Após a inoculação, os tubos foram incubados a 25° C por pelo menos 48 h ou até 15 dias. A degradação do carboidrato é indicada pela viragem do indicador de pH azul de bromotimol para amarelo.

Avaliação da produção de pigmento

A avaliação da produção de pigmento fluorescente foi baseado em metodologia descrita por Arnaut-Rollier, Zutter e Hoof (1999). Para a realização do teste, o meio de cultura ágar King B foi formulado de acordo com a composição típica (g/L) determinada pelo fabricante: proteose peptona 20,0; sulfato de magnésio 1,5; fosfato de tri-potássio 3-hidratado 2,8 e agar-agar 10,0. Os ingredientes foram suspendidos juntamente com a adição de 10 g de glicerol para litro de meio de cultura produzido. Para a realização deste teste, somente foram utilizados os isolados suspeitos confirmados pelo teste de utilização da glicose em meio de cultura OF. A produção de pigmento fluorescente foi observado após o período mínimo de 72 h a 25° C e avaliados sob luz branca e luz UV.

Figura 25. Avaliação da produção de pigmento fluorescente sob luz branca (A) e luz UV (B)

Identificação bioquímica pelo kit API® 20 NE

Para a identificação da espécie, foi utilizado o sistema de identificação de bacilos Gram negativos não enterobactérias e não fastidiosos API® 20 NE (bioMérieux) que combina 8 testes convencionais, 12 testes de assimilação e uma base de dados. O procedimento para a realização do teste, leitura e interpretação dos resultados foi baseado de acordo com instruções do fabricante.

Manutenção das culturas bacterianas

Os isolados identificados foram mantidos a temperatura de -70° C em caldo BHI (Oxoid) adicionado de glicerol (Synth).

8.2 ANEXO 2

Listeria monocytogenes

Tabela 20. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	21,38333	0,633333	33,7632	0,000876	19,5340	23,2327
CaCl ₂ (%) (L)	-3,66375	0,775672	-9,4467	0,011021	-9,5925	-5,0625
CaCl ₂ (%) (Q)	-2,71848	0,923234	-5,8890	0,027644	-8,1328	-2,7411
OE cravo (%) (L)	15,80259	0,775672	40,7456	0,000602	29,3402	33,8701
OE cravo (%) (Q)	4,85627	0,923234	10,5201	0,008915	7,0167	12,4084
CaCl ₂ xOE cravo	-8,15250	1,096966	-14,8637	0,004496	-19,5081	-13,1019

Tabela 21. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	107,385	1	107,385	89,239	0,011021
CaCl ₂ (%) (Q)	41,732	1	41,732	34,681	0,027644
OE cravo (%) (L)	1997,774	1	1997,774	1660,200	0,000602
OE cravo (%) (Q)	133,177	1	133,177	110,673	0,008915
CaCl ₂ xOE cravo	265,853	1	265,853	220,930	0,004496
Lack of Fit	487,801	3	162,600	135,125	0,007355
Erro puro	2,407	2	1,203		
Total	3100,698	10			

$R^2 = 0,8419$; $F_{0,90; 5; 5} = 3,45$; $F\text{-calc} = 5,33$

Figura 26. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes**Tabela 22.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Listeria monytopogenes* – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	62,83 ± 9,52	38,79	25,61	39,77
A	0,0316	1,0	62,70 ± 11,90	41,65	21,05	50,54
B	0,02	0,884	61,98 ± 7,71	38,92	23,06	37,20

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

S. Give

Tabela 23. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *S. Give*

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	16,49333	0,586667	28,1136	0,001263	14,7803	18,20639
CaCl ₂ (%) (L)	-1,21024	0,718517	-3,3687	0,077955	-4,5185	-0,32241
CaCl ₂ (%) (Q)	-4,94104	0,855206	-11,5552	0,007406	-12,3793	-7,38489
OE cravo (%) (L)	12,65151	0,718517	35,2156	0,000805	23,2050	27,40107
OE cravo (%) (Q)	0,68646	0,855206	1,6054	0,249633	-1,1243	3,87011
CaCl ₂ x OE cravo	-6,05500	1,016136	-11,9177	0,006967	-15,0771	-9,14290

Tabela 24. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *S. Give*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	11,717	1	11,717	11,348	0,077955
CaCl ₂ (%) (Q)	137,867	1	137,867	133,523	0,007406
OE cravo (%) (L)	1280,485	1	1280,485	1240,139	0,000805
OE cravo (%) (Q)	2,661	1	2,661	2,577	0,249633
CaCl ₂ x OE cravo	146,652	1	146,652	142,031	0,006967
Lack of Fit	214,054	3	71,351	69,103	0,014299
Erro puro	2,065	2	1,033		
Total	1821,143	10			

$$R^2 = 0,88133; F_{0,90; 4; 6} = 3,18; F\text{-calc} = 10,99$$

Figura 27. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *S. Give*

S. Give**Tabela 25.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Salmonella* Give – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	38,71 ± 9,52	27,28	11,43	24,36
A	0,0316	1,0	37,50 ± 7,71	28,70	8,8	30,66
B	0,02	0,884	36,85 ± 6,54	27,42	9,43	25,59

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

S. Enteritidis

Tabela 26. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *S. Enteritidis*

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	15,90667	0,586667	27,1136	0,001357	14,1936	17,61972
CaCl ₂ (%) (L)	-0,66709	0,718517	-1,8569	0,204459	-3,4322	0,76388
CaCl ₂ (%) (Q)	-4,67396	0,855206	-10,9306	0,008266	-11,8451	-6,85073
OE cravo (%) (L)	12,98060	0,718517	36,1317	0,000765	23,8631	28,05927
OE cravo (%) (Q)	1,36854	0,855206	3,2005	0,085318	0,2399	5,23427
CaCl ₂ xOE cravo	-5,54500	1,016136	-10,9139	0,008291	-14,0571	-8,12290

Tabela 27. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *S. Enteritidis*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	3,560	1	3,560	3,448	0,204459
CaCl ₂ (%) (Q)	123,365	1	123,365	119,478	0,008266
OE cravo (%) (L)	1347,968	1	1347,968	1305,496	0,000765
OE cravo (%) (Q)	10,576	1	10,576	10,243	0,085318
CaCl ₂ xOE cravo	122,988	1	122,988	119,113	0,008291
Lack of Fit	193,671	3	64,557	62,523	0,015784
Erro puro	2,065	2	1,033		
Total	1840,138	10			

$$R^2 = 0,8936; F_{0,90; 4; 6} = 3,18; F\text{-calc} = 12,35$$

Figura 28. Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *S. Enteritidis*

S. Enteritidis**Tabela 28.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Salmonella* Enteritidis – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	37,50 ± 5,11	28,29	9,21	24,56
A	0,0316	1,0	39,53 ± 7,71	30,07	9,46	23,93
B	0,02	0,884	36,85 ± 6,54	28,34	8,51	23,09

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Tabela 29. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	9,73333	0,546667	17,8049	0,003140	8,1371	11,3296
CaCl ₂ (%) (L)	-3,57500	0,669527	-10,6792	0,008655	-9,1050	-5,1950
CaCl ₂ (%) (Q)	-4,74792	0,796897	-11,9160	0,006969	-11,8228	-7,1689
OE cravo (%) (L)	8,29494	0,669527	24,7785	0,001625	14,6349	18,5449
OE cravo (%) (Q)	1,92708	0,796897	4,8365	0,040191	1,5272	6,1811
CaCl ₂ x OE cravo	-7,15000	0,946854	-15,1026	0,004356	-17,0648	-11,5352

Tabela 30. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	102,245	1	102,2450	114,0448	0,008655
CaCl ₂ (%) (Q)	127,300	1	127,3000	141,9914	0,006969
OE cravo (%) (L)	550,448	1	550,4479	613,9738	0,001625
OE cravo (%) (Q)	20,971	1	20,9712	23,3914	0,040191
CaCl ₂ x OE cravo	204,490	1	204,4900	228,0897	0,004356
Lack of Fit	113,183	3	37,7278	42,0818	0,023301
Erro puro	1,793	2	0,8965		
Total	1167,743	10			

$R^2 = 0,80308$; $F_{0,90; 5; 5} = 3,45$; F-calc = 9,16

Figura 29. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *P. aeruginosa* ATCC 27583

Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853*Tabela 31.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	25,60 ± 3,64	18,25	7,35	28,71
A	0,0316	1,0	26,70 ± 5,11	19,61	7,09	26,55
B	0,02	0,884	26,87 ± 6,54	18,37	8,50	31,63

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

***Pseudomonas fluorescens* QaF01**

Tabela 32. Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas fluorescens* QaF01

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	15,90667	0,586667	27,1136	0,001357	14,1936	17,61972
CaCl ₂ (%) (L)	-1,21024	0,718517	-3,3687	0,077955	-4,5185	-0,32241
CaCl ₂ (%) (Q)	-3,77646	0,855206	-8,8317	0,012579	-10,0501	-5,05573
OE cravo (%) (L)	10,18724	0,718517	28,3563	0,001241	18,2764	22,47254
OE cravo (%) (Q)	-1,63396	0,855206	-3,8212	0,062168	-5,7651	-0,77073
CaCl ₂ x OE cravo	-6,05500	1,016136	-11,9177	0,006967	-15,0771	-9,14290

Tabela 33. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas fluorescens* QaF01

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	11,717	1	11,7174	11,3482	0,077955
CaCl ₂ (%) (Q)	80,536	1	80,5363	77,9987	0,012579
OE cravo (%) (L)	830,239	1	830,2390	804,0796	0,001241
OE cravo (%) (Q)	15,077	1	15,0766	14,6016	0,062168
CaCl ₂ x OE cravo	146,652	1	146,6521	142,0313	0,006967
Lack of Fit	369,678	3	123,2260	119,3434	0,008321
Erro puro	2,065	2	1,0325		
Total	1442,580	10			

$$R^2 = 0,7423; F_{0,90; 5; 5} = 3,45; F\text{-calc} = 2,88$$

Figura 30. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *P. fluorescens* QaF01

Pseudomonas fluorescens* QaF01*Tabela 34.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Pseudomonas fluorescens* QaF01 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	32,44 ± 7,71	23,35	8,89	27,40
A	0,0316	1,0	30,34 ± 7,04	24,14	6,20	20,44
B	0,02	0,884	28,97 ± 5,77	23,46	5,51	19,01

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Pseudomonas fluorescens* Lb03*Tabela 35.** Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas fluorescens* Lb03

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	14,77333	0,546667	27,0244	0,001366	13,1771	16,36959
CaCl ₂ (%) (L)	-0,28334	0,669527	-0,8464	0,486460	-2,5217	1,38833
CaCl ₂ (%) (Q)	-3,54604	0,796897	-8,8996	0,012392	-9,4190	-4,76516
OE cravo (%) (L)	9,47687	0,669527	28,3091	0,001245	16,9987	20,90874
OE cravo (%) (Q)	-1,33604	0,796897	-3,3531	0,078598	-4,9990	-0,34516
CaCl ₂ x OE cravo	-4,77750	0,946854	-10,0913	0,009678	-12,3198	-6,79020

Tabela 36. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas fluorescens* Lb03

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	0,642	1	0,6423	0,7164	0,486460
CaCl ₂ (%) (Q)	71,008	1	71,0084	79,2033	0,012392
OE cravo (%) (L)	718,488	1	718,4880	801,4069	0,001245
OE cravo (%) (Q)	10,080	1	10,0800	11,2434	0,078598
CaCl ₂ x OE cravo	91,298	1	91,2980	101,8345	0,009678
Lack of Fit	222,078	3	74,0259	82,5691	0,011990
Erro puro	1,793	2	0,8965		
Total	1105,839	10			

$$R^2 = 0,79756; F_{0,90; 4; 6} = 3,18; F\text{-calc} = 5,89$$

Figura 31. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *P. fluorescens* Lb03

Pseudomonas fluorescens* Lb03*Tabela 37.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Pseudomonas fluorescens* Lb03 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	34,63 ± 6,87	21,97	12,72	36,73
A	0,0316	1,0	32,78 ± 5,57	22,76	10,02	30,57
B	0,02	0,884	30,87 ± 4,03	22,02	8,85	28,67

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Pseudomonas putida* Kb04*Tabela 38.** Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas putida* Kb04

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	14,77333	0,546667	27,0244	0,001366	13,1771	16,3696
CaCl ₂ (%) (L)	-1,47899	0,669527	-4,4180	0,047604	-4,9130	-1,0030
CaCl ₂ (%) (Q)	-3,31167	0,796897	-8,3114	0,014169	-8,9503	-4,2964
OE cravo (%) (L)	11,13024	0,669527	33,2481	0,000903	20,3055	24,2155
OE cravo (%) (Q)	-0,21917	0,796897	-0,5501	0,637509	-2,7653	1,8886
CaCl ₂ xOE cravo	-6,59250	0,946854	-13,9251	0,005118	-15,9498	-10,4202

Tabela 39. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas putida* Kb04

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	17,499	1	17,4992	19,519	0,047604
CaCl ₂ (%) (Q)	61,932	1	61,9321	69,079	0,014169
OE cravo (%) (L)	991,058	1	991,0583	1105,434	0,000903
OE cravo (%) (Q)	0,271	1	0,2713	0,303	0,637509
CaCl ₂ xOE cravo	173,844	1	173,8442	193,907	0,005118
Lack of Fit	359,653	3	119,8843	133,720	0,007432
Erro puro	1,793	2	0,8965		
Total	1609,302	10			

$R^2 = 0,7754$; $F_{0,90; 4; 6} = 3,18$; $F\text{-calc} = 5,17$

Figura 32. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *P. putida* Kb04

Pseudomonas putida* Kb04*Tabela 40.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Pseudomonas putida* Kb04 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	39,85 ± 7,25	24,37	15,48	38,85
A	0,0316	1,0	40,03 ± 6,64	25,64	14,39	35,95
B	0,02	0,884	41,68 ± 5,01	24,46	17,22	41,31

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo

Pseudomonas putida* Ia03*Tabela 41.** Coeficientes de regressão para a variável resposta zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas putida* Ia03

Fatores	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor	Lim. de conf. -90%	Lim. de conf. +90%
Média	14,77333	0,546667	27,0244	0,001366	13,1771	16,3696
CaCl ₂ (%) (L)	-1,47899	0,669527	-4,4180	0,047604	-4,9130	-1,0030
CaCl ₂ (%) (Q)	-3,31167	0,796897	-8,3114	0,014169	-8,9503	-4,2964
OE cravo (%) (L)	11,13024	0,669527	33,2481	0,000903	20,3055	24,2155
OE cravo (%) (Q)	-0,21917	0,796897	-0,5501	0,637509	-2,7653	1,8886
CaCl ₂ xOE cravo	-6,59250	0,946854	-13,9251	0,005118	-15,9498	-10,4202

Tabela 42. ANOVA para a zona de inibição antimicrobiana contra *Pseudomonas putida* Ia03

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
CaCl ₂ (%) (L)	17,499	1	17,4992	19,519	0,047604
CaCl ₂ (%) (Q)	61,932	1	61,9321	69,079	0,014169
OE cravo (%) (L)	991,058	1	991,0583	1105,434	0,000903
OE cravo (%) (Q)	0,271	1	0,2713	0,303	0,637509
CaCl ₂ xOE cravo	173,844	1	173,8442	193,907	0,005118
Lack of Fit	359,653	3	119,8843	133,720	0,007432
Erro puro	1,793	2	0,8965		
Total	1609,302	10			

$$R^2 = 0,7754; F_{0,90; 4; 6} = 3,18; F\text{-calc} = 5,17$$

Figura 33. Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta zona de inibição antimicrobiana contra *P. putida* Ia03

Pseudomonas putida* Ia03*Tabela 43.** Valores da zona de inibição antimicrobiana (ZI) em mm² contra *Pseudomonas putida* Ia03 – valores experimentais, previstos pelo modelo, desvios e desvio relativo

Ensaio	CaCl ₂ (%)	OE cravo (%)	ZI experimental (mm ²)	ZI modelo (mm ²)	Desvio (y-y') *	Desvio relativo ZI (%)
3 *	0,0316	0,884	41,69 ± 3,97	24,37	17,32	41,54
A	0,0316	1,0	39,84 ± 7,01	25,64	14,20	35,64
B	0,02	0,884	40,04 ± 2,87	24,46	15,58	38,91

* repetição do ensaio da condição 3 definido pelo planejamento experimental

**desvio=diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo