

1 INTRODUÇÃO

Todo alimento possui suas características próprias de sabor, cor, odor e aparência. Os microrganismos em geral utilizam os alimentos como fonte de nutrientes para seu crescimento e podem desta forma promover alterações significativas nestas características. Dependendo da alteração causada, o alimento pode ser rejeitado pelo consumidor devido às mudanças ocorridas e as alterações podem ainda causar intoxicações e doenças (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; PAULI, 2001).

Os alimentos têm como principais fontes de contaminação microbiana o solo, a água, o ar, os utensílios utilizados para sua produção ou manuseio e os manipuladores dos alimentos (FRANCO, 1996).

O estilo de vida dos consumidores tem gerado desafios aos fabricantes de alimentos, pois a demanda por produtos que, além de seguros microbiologicamente, sejam convenientes, tenha longa vida de prateleira e boas características sensoriais têm crescido (MOREIRA *et al.*, 2005; NIELSEN; RIOS, 2000).

Ingredientes químicos têm sido utilizados para reduzir ou eliminar o desenvolvimento de microrganismos nas mais diversas aplicações alimentícias (JAY, 1992). Porém, a diminuição do uso de ingredientes químicos é uma tendência atual devido ao aumento da consciência dos consumidores quanto aos possíveis riscos a que estão sujeitos (BURT, 2004; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004, FERNÁNDEZ-LOPEZ *et al.*, 2005; NIELSEN; RIOS, 2000; SINGH *et al.*, 2003; VALERO; GINER, 2006).

Ingredientes naturais têm sido usados uma vez que sua ação antimicrobiana é comprovada quanto à inibição do crescimento de microrganismos tais como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002), *Listeria monocytogenes* (MYTLE *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2003), *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger* (NIELSEN; RIOS, 2000) e *Pseudomonas putida* (OUSSALAH *et al.*, 2006).

Ingredientes naturais antimicrobianos podem ser constituintes de embalagens ativas que são caracterizadas como embalagens que além de proteger o produto, modificam a condição interna da embalagem de forma a manter as características

sensoriais e de qualidade do produto por período prolongado. Essas embalagens são conhecidas como embalagens ativas antimicrobianas (LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004; VERMEIREN *et al.*, 1999).

A vantagem do uso dos ingredientes antimicrobianos naturais como matéria-prima de embalagens ao invés de agregá-los à formulação do produto alimentício, deve-se ao fato de que a adição dos ingredientes, em níveis nos quais se perceba efeito antimicrobiano, pode alterar o sabor e características dos alimentos (BURT, 2004; HSIEH; MAU; HUANG, 2001).

A adição de ingredientes antimicrobianos ocorre em geral em polímeros convencionais. A possibilidade de se aplicar estes ingredientes em embalagens biodegradáveis, tendo como base matérias-primas naturais como fécula de mandioca, teria impacto na redução de resíduos de embalagem que acarretam danos ao meio ambiente (PARRA *et al.*, 2004; SEYDIM; SARIKUS, 2006).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de fécula de mandioca (FAO, 2006) que é uma matéria-prima de baixo custo e que possui ampla gama de aplicações. Trabalhos existentes na literatura indicam que biofilmes desenvolvidos à base de fécula de mandioca apresentaram resultados positivos e promissores (PARRA *et al.*, 2004; VEIGA-SANTOS, 2004).

Existem diversos ingredientes com ação antimicrobiana comprovada tais como produtos ou derivados de cravo (KARAPINAR; AKTUG, 1987; MATAN *et al.*, 2005; MYTLE *et al.*, 2006; NIELSEN; RIOS, 2000) canela (GUYNOT *et al.*, 2005; MATAN *et al.*, 2005; NIELSEN; RIOS, 2000), pimenta (CAREAGA *et al.*, 2003; PRASAD; SEENAYYA, 2000), laranja (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2005), café (DAGLIA *et al.*, 1998), mel (MUNDO; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2004) e extrato de própolis (CHOI *et al.*, 2006; SFORCIN *et al.*, 2000). O uso dos ingredientes citados em embalagens antimicrobianas possibilitaria a agregação de valor a estas matérias-primas, que são produzidas e exportadas pelo Brasil (FAO, 2006).

Este trabalho teve como objetivo preliminar o estudo do efeito da adição dos ingredientes antimicrobianos cravo em pó, canela em pó, pimenta vermelha em pó, óleo essencial de laranja, café em pó, mel e extrato de própolis, em filmes biodegradáveis à base de fécula de mandioca. Estudouse a influência da adição dos ingredientes nas

propriedades de barreira ao vapor de água (permeabilidade ao vapor de água e taxa de permeabilidade ao vapor de água) e propriedades mecânicas (resistência máxima à tração e porcentagem de alongamento na ruptura) no filme biodegradável definido como base.

O objetivo específico do trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano dos ingredientes quando adicionados em filme biodegradável. Nesta etapa somente os ingredientes que apresentaram melhor desempenho em relação às propriedades de embalagem e mostraram-se mais promissores foram utilizados na formulação dos biofilmes. A avaliação foi realizada por meio da contagem total de bolores e leveduras em amostras de pão tipo forma, embalados junto com os biofilmes e mantidos desta forma por 3 e 7 dias. A determinação das propriedades mecânicas (resistência máxima à tração e porcentagem de alongamento na ruptura) de todos os biofilmes elaborados com a adição dos ingredientes mais promissores também foi realizada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos e alimentos

A deterioração de alimentos e as mudanças promovidas em suas características sensoriais pela ação dos microrganismos sempre estiveram presentes na história da humanidade. Porém é extremamente difícil definir em que momento da história os consumidores começaram a se preocupar com esses efeitos. Sabe-se que a primeira pessoa a conseguir entender o papel dos microrganismos em alimentos foi Pasteur em 1837. Ele provou que o leite tornava-se azedo, ácido, pelo efeito dos microrganismos presentes. Em 1860, utilizando aquecimento (atualmente o processo é conhecido como pasteurização) ele demonstrou que o processo era efetivo para destruir microrganismos contaminantes em vinho e cerveja (JAY, 1992).

Um alimento deteriorado pode ser definido como um produto que é considerado inaceitável para o consumidor. As maiores razões para um alimento ser considerado deteriorado são: mudanças sensoriais capazes de alterar as características esperadas para o alimento; mudanças químicas como a oxidação de gorduras, escurecimento enzimático, entre outras e danos físicos (GARBUTT, 1997; MILLER; KROCHTA, 1997).

Os microrganismos de maior interesse em alimentos são os fungos (bolores e leveduras) e as bactérias. Estes dois grupos, dependendo do tipo de interação que ocorre entre eles e o alimento, classificam-se em deteriorantes, patogênicos ou aqueles que causam alterações benéficas ao alimento (FRANCO, 1996).

Chamam-se deteriorantes aqueles que promovem alterações indesejáveis no alimento como mudanças na coloração, textura e sabor, sempre de forma prejudicial enquanto que os patogênicos são os que provocam doenças no consumidor. Há também aqueles que promovem alterações benéficas e são utilizados na fabricação de vinhos, pães, iogurtes, queijos entre outros produtos (FRANCO, 1996).

Cada tipo de produto apresenta uma composição diferente e por isso a flora microbiana aos quais está sujeito e as possíveis alterações do produto final são distintas. Os microrganismos presentes competem por nutrientes e normalmente um deles é dominante e promove a alteração indesejável no alimento (GARBUTT, 1997).

As maiores perdas em alimentos ocorrem devido às alterações promovidas por microrganismos e vários processos químicos e físicos vêm sendo desenvolvidos para reduzi-las ou evitá-las (DURANGO; SOARES; ANDRADE, 2006).

2.2 Inibição do crescimento microbiano em alimentos

O controle do crescimento microbiano pode ser atingido por métodos térmicos (pasteurização, esterilização, resfriamento), métodos de controle da água disponível (congelamento, secagem, liofilização, concentração), métodos físicos (filtração e centrifugação), irradiação, por modificação na composição dos alimentos (atividade de água, pH, umidade) e por uso de ingredientes naturais ou químicos que possuam ação antimicrobiana (FARKAS, 1997; MOSSEL; GARCIA, [1985?]).

Os ingredientes antimicrobianos são compostos que quando estão em contato com o alimento possuem o poder de inibir o crescimento antimicrobiano ou destruir os microrganismos presentes (DAVIDSON, 1997) e podem ser utilizados como parte das matérias-primas do alimento, ser aplicados na superfície dos mesmos ou fazerem parte das embalagens dos produtos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Diversos ingredientes têm sido utilizados para controle microbiológico de alimentos com destaque para os ingredientes antimicrobianos químicos. Estes ingredientes possuem em geral limites máximos de uso devido aos possíveis riscos provocados pelo seu consumo, estabelecidos de acordo com o produto no qual o ingrediente será aplicado (JAY, 1992).

Os antimicrobianos químicos mais usados são o ácido benzóico, benzoato de sódio, propionato de cálcio ou sódio, ácido sórbico e os antimicrobianos naturais são as especiarias e seus derivados (CUPPET, 1994; ARORA; KAUR, 1999).

2.3 Ação dos ingredientes antimicrobianos

A maioria dos antimicrobianos utilizados em alimentos apresenta ação bacteriostática e não bactericida. Desta forma, a vida útil dos produtos é prolongada,

mas não de forma indefinida uma vez que os microrganismos ainda presentes continuam promovendo modificações no alimento (DAVIDSON, 1997).

Entre os fatores que afetam a eficácia da ação dos antimicrobianos, podem-se destacar a concentração da substância considerada antimicrobiana, a espécie e a quantidade de microrganismos presentes no alimento, temperatura e as propriedades químicas e físicas do substrato. Um determinado ingrediente pode apresentar um significativo efeito antimicrobiano a uma dada concentração e apresentar efeito nulo caso esteja diluído. No caso específico dos antimicrobianos naturais como as especiarias e seus derivados, a variação inerente ao lote estudado assim como as condições de cultivo, armazenamento e processamento dos mesmos podem influenciar o efeito antimicrobiano apresentado (FERNÁNDEZ-LOPEZ *et al.*, 2005; FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

O pH é o principal fator influenciador do efeito da ação da maioria dos ingredientes antimicrobianos. Sabe-se que muitos antimicrobianos são ácidos fracos e são mais eficazes na sua forma não dissociada, pois possuem mais facilidade de penetrar na membrana celular desta forma. Quanto menor o pH maior o efeito antimicrobiano devido a maior proporção do ingrediente na forma não dissociada (DAVIDSON, 1997; FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Os ingredientes naturais, em diversos estudos, são avaliados quanto ao seu efeito antimicrobiano, na forma de óleos essenciais ou resinas (HSIEH; MAU; HUANG, 2001; MOREIRA *et al.*; 2005; NGUEFACK *et al.*, 2004; NIELSEN; RIOS, 2000; OUATTARA; SABATO; LACROIX, 2001; OUSSALAH *et al.*, 2006; SEYDIM; SARIKUS, 2006; SUHR; NIELSEN, 2004; VALERO; GINER, 2006) ou na forma de pó (PRASAD; SEENAYYA, 2000; TSEGAYE; EPHRAIM; ASHENAFI, 2004). Estes produtos possuem em sua composição componentes tais com eugenol, trans-cinamaldeído, carvacrol, timol, aldeído cinâmico responsáveis pela inibição microbiana.

O mecanismo de ação dos ingredientes antimicrobianos não é bem definido. Acredita-se que um dos mecanismos de ação dos compostos é por modificações na parede ou membrana celular, tornando-a mais permeável e desta forma ocorre a perda de material celular, causando a morte da célula. Atuam também em atividades principais da célula como o metabolismo de enzimas e na síntese de compostos e são

capazes de coagular o citoplasma, inibindo o crescimento microbiano (BURT, 2004; DAVIDSON, 1997; FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Suhr e Nielsen (2004) estudaram o efeito dos ingredientes antimicrobianos propionato de cálcio, sorbato de potássio e benzoato de sódio, sob diferentes condições de pH (4,7-7,4) e atividade de água (0,80-0,95) dos meios de cultura, no crescimento de fungos, comumente encontrados em produtos de panificação. Os valores de pH e atividade de água estudados estão na faixa comumente encontradas em produtos de panificação. Os autores acima citados concluíram que quanto maior a atividade de água e o pH, menor foi o efeito antifúngico dos ingredientes testados e que o propionato de cálcio foi o menos eficaz entre os ingredientes estudados.

Apesar da eficiência dos ingredientes antimicrobianos químicos, os fabricantes de alimentos têm enfrentado o desafio de reduzir o uso destes ingredientes para atender a demanda de consumidores cada vez mais preocupados com sua saúde e segurança alimentar. A ingestão de alimentos, adicionados de produtos químicos, que apresentem riscos potenciais à saúde do consumidor, têm gerado discussões e exigências do mercado por produtos menos processados industrialmente e produzidos com adição de ingredientes naturais (MOREIRA *et al.*, 2005; NIELSEN; RIOS, 2000; OZDEMIR; FLOROS, 2004; SUPPAKUL *et al.*, 2003).

O mercado exige produtos que além de seguros microbiologicamente apresentem características de sabor e aroma próximas do produto fresco e tenham sido processados o mínimo possível. Somado a estas características, o produto deve apresentar vida útil longa e coerente com as novas necessidades de consumo (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; MOREIRA *et al.*, 2005; OUTATTARA; SABATO; LACROIX, 2001; VALERO; GINER, 2006).

Para que as exigências de mercado sejam atendidas, o uso de ingredientes antimicrobianos naturais representa uma alternativa visto que o efeito desses ingredientes tais como especiarias, ervas, frutas e seus derivados têm sido comprovado por pesquisadores, há mais de cem anos (BULLERMAN; LIEU; SEIRE, 1977 apud GUYNOT *et al.*, 2005)¹.

¹ BULLERMAN, L. B.; LIEU, F. Y.; SEIRE, A. S. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*, v. 42, p. 1107-1116, 1977.

Especiarias são as raízes, casca, sementes, bulbos, folhas ou frutos de plantas aromáticas adicionadas aos alimentos de forma a promover algum efeito no sabor e odor. Apesar disso, sabe-se há muito tempo que as especiarias e seus derivados possuem efeito antimicrobiano de distintas intensidades. O mais antigo registro do uso de especiarias como conservantes data de 1550 antes de Cristo, quando os egípcios usavam as especiarias para conservarem alimentos e embalsamarem mortos (DAVIDSON, 1997).

Singh *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais (tomilho, cravo, pimenta, alecrim e sálvia) no crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes* tanto *in vitro* como em sistemas alimentícios. Os ensaios *in vitro* foram realizados com o uso de meio de cultura PCA e agar contendo 10^9 UFC/ mL da bactéria. Discos de papel, contendo quantidades fixas de soluções diluídas de óleos essenciais foram colocados na superfície dos meios de cultura e foram incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. As placas foram inspecionadas visualmente quanto à zona de inibição formada ao redor dos discos de papel. Um ensaio controle foi realizado com discos de papel embebidos em etanol. Os óleos essenciais de tomilho, cravo e pimenta foram avaliados como os mais eficazes com base nos ensaios *in vitro* por serem altamente efetivos na inibição do crescimento da *Listeria monocytogenes*. Já para o estudo com sistema alimentício, salsichas de carne vermelha com distintas porcentagens de gordura foram utilizadas. As salsichas foram mergulhadas em uma suspensão bacteriana e posteriormente colocadas em contato com soluções dos óleos essenciais selecionados (tomilho, cravo e pimenta) e amostras foram avaliadas quanto à população de *Listeria monocytogenes*. Por meio do estudo, concluiu-se que o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais foi comprovado *in vitro*, porém foi expresso de forma reduzida no sistema alimentício escolhido provavelmente pela interação dos óleos essenciais com os outros componentes do sistema.

Moreira *et al.* (2005), estudaram o efeito dos óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus globules*), tea tree (*Melaleuca altenifolia*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*), roseira selvagem (*Rosa moschata*), cravo (*Syzygium aomaticum*), limão (*Citrus limonum*), orégano (*Origanum vulgare*), pinho (*Pinus silvestrys*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) no crescimento de diferentes cepas de

Escherichia coli O157:H7. As diferentes cepas foram inoculadas em meio de cultura (BHI) e discos de papel previamente embebidos nos óleos essenciais puros foram colocados na superfície dos meios. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. A partir da análise das zonas de inibição formadas concluiu-se que não houve diferença entre os efeitos observados para as distintas cepas utilizadas. O óleo essencial de cravo apresentou efeito mais significativo que os demais na inibição do crescimento do microrganismo além de ter-se constatado que menores doses deste óleo essencial foram necessárias para redução de 90% das colônias (em relação ao ensaio controle).

Nielsen e Rios (2000) avaliaram o efeito dos componentes voláteis dos compostos óleo essencial de mostarda e alho, óleo resina de canela, orégano, cravo e baunilha no crescimento de fungos comumente encontrados em produtos de panificação (*Aspergillus flavus*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium commune*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium solitum*). Meios de cultura (Czapek yeast extract Agar - CYA) foram inoculados em três pontos distintos em cada placa com os fungos estudados. Volumes de 1, 10 ou 100 µL dos diferentes óleos essenciais foram despejados em discos de papel que foram posicionados no centro de placas de petri. Papel de filtro adicionado de 100 µL de água foi utilizado como controle. As placas de petri com os discos de papel foram cobertas pelas placas de petri com os meios de cultura inoculados com os microrganismos. As placas foram seladas hermeticamente para evitar a perda dos gases voláteis. Os conjuntos foram incubados a 25 °C na ausência de luz. O diâmetro das colônias formado após 3, 5, 7 e 14 dias foi avaliado e comparado com o controle. Os resultados indicaram que o óleo essencial de mostarda apresentou o maior poder inibitório. Óleos essenciais de canela, alho e cravo apresentaram alta atividade enquanto o óleo resina de orégano somente apresentou fraco efeito e o de baunilha não teve seu efeito expresso.

Guynot *et al.* (2005) estudaram o efeito antifúngico de 20 óleos essenciais (limão siciliano, capim limão, erva doce, tangerina, pomelo, canela, laranja, limão, eucalipto, hortelã, alecrim, tomilho, manjerição, funcho, pinho silvestre, menta, gengibre, louro, cravo e sálvia) no crescimento dos fungos *Eurotium spp.*, *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* em um total de 7 microrganismos diferentes, todos conhecidos como responsáveis por deterioração de produtos de panificação. Soluções produzidas com os óleos

essenciais estudados variando de concentrações finais de 0 a 1000 ppm (0,1%) foram adicionadas em meio de cultura de agar preparado com 2% de farinha de trigo em sua composição. As placas foram incubadas a 25 °C por 42 dias e a medida de avaliação usada foi a determinação do diâmetro das colônias formadas. A atividade antifúngica foi avaliada em dois distintos valores de pH (5 e 7,5) e de atividade de água dos meios de cultura (0,80-0,90).

Como conclusão do estudo obteve-se que somente os óleos essenciais de canela, alecrim, tomilho, louro e cravo exibiram atividade antifúngica sobre todos os microrganismos estudados. Em geral, quanto maior a atividade de água do meio, maior foi a inibição promovida pelos óleos essenciais, porém em alguns casos para atividades de água de 0,80, a adição dos óleos essenciais favoreceu o crescimento dos fungos.

A influência da concentração dos óleos essenciais na inibição dos microrganismos estudados mostrou-se dependente do pH do meio. De acordo com o pH, um aumento da concentração do óleo essencial pode aumentar o efeito antifúngico ou não promover alterações significativas.

2.4 Embalagens ativas

As embalagens tornaram-se elementos essenciais para a comercialização de alimentos atualmente, uma vez que a distribuição de produtos no mercado exige muitas vezes que o mesmo percorra longas distâncias até seu destino final. Durante o período de tempo entre a embalagem do produto e o consumo do mesmo, alterações ou danos indesejáveis podem modificar sua qualidade de forma irreversível (FRANKE; WIJMA; BOUMA, 2002 ; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004; SKANDAMIS; NYCHAS, 2002; STEINKA *et al.*, 2005; STRATHMANN; PASTORELLI; SIMONEAU, 2005).

Grandes perdas em alimentos são causadas por deterioração microbiana. Várias ações podem ser realizadas para diminuir o contato entre os microrganismos e os alimentos entre eles, o uso de embalagens adequadas ao produto e sua conservação é fundamental (BURT, 2004; DURANGO; SOARES; ANDRADE, 2006; DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

As embalagens ativas estão incluídas no grupo de produtos resultantes das pesquisas a respeito de novas tecnologias para preservação de alimentos. São chamadas de ativas por não apresentarem uma atitude passiva em relação à conservação do alimento como ocorre com as embalagens tradicionais, que apenas protegem o produto contra influências externas indesejáveis (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004; LABUZA, BRENNE, 1989).

Embalagens ativas são definidas como materiais que interagem com o alimento ou modificam a atmosfera interna à qual o produto está exposto. O objetivo do uso das embalagens é aumentar a vida útil dos produtos embalados e ao mesmo tempo manter a qualidade e a segurança dos mesmos (LABUZA, BRENNE, 1989; OZDEMIR; FLOROS, 2004; QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

As embalagens agem de forma a reter ou absorver moléculas (por exemplo, oxigênio e aldeídos) ou liberar substâncias tais como etanol, componentes voláteis antimicrobianos e dióxido de carbono. As primeiras embalagens ativas desenvolvidas foram as que previam a inclusão de um sachê, contendo o ingrediente ativo dentro da embalagem do produto alimentício. Em termos operacionais esta solução mostrou-se muito positiva e simples de ser incorporada uma vez que não havia necessidade de mudanças em equipamentos ou processos de embalagem de produtos. Porém, o risco de ingestão acidental do sachê, muitas vezes adicionado de produto tóxico, foi considerado uma desvantagem deste tipo de técnica (LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004).

Entre as embalagens ativas disponíveis podem-se destacar as seqüestrantes ou geradora de gases, as reguladoras de umidade e as antimicrobianas (SUPPAKUL *et al.*, 2003).

2.4.1 Embalagens seqüestrantes ou geradoras de gases

As embalagens seqüestrantes são capazes de absorver gases presentes na mistura gasosa presente na parte interna da embalagem. Estes gases podem ser gerados por reações que ocorrem no produto embalado, durante sua vida útil ou gases que migram para a parte interna da embalagem devido à permeabilidade do material utilizado. Em ambos os casos, os gases podem permitir a ocorrência de modificações

indesejáveis no produto. A tecnologia empregada nas embalagens seqüestrantes de oxigênio, por exemplo, é baseada nas reações de oxidação de uma ou mais das seguintes substâncias: ferro em pó, ácido ascórbico, enzimas como a glucose-oxidase por exemplo, ácidos graxos insaturados entre outras. As substâncias em geral são incorporadas à embalagem na forma de um sachê.

As embalagens geradoras são capazes de produzir gases como o dióxido de carbono ou o etanol com o objetivo de impedir ou retardar efeitos de deterioração provocados por microrganismos no produto embalado (SUPPAKUL *et al.*, 2003).

2.4.2 Embalagens reguladoras de umidade

A transferência de umidade entre o alimento embalado e o ambiente externo à embalagem pode causar alterações importantes e negativas no aspecto visual e nas características sensoriais e nutricionais do produto, além de promover deterioração microbiana (AYDINLI; TUTAS, 2000; SARANTOPÓULOS *et al.*, 2002).

Altos conteúdos de umidade em produtos como biscoitos, salgadinhos entre outros, caracterizados como crocantes, pode favorecer a rejeição do produto por parte do consumidor. Por outro lado, a perda significativa de água, pode tornar a textura de um produto inadequada (VERMEIREN *et al.*, 1999).

As embalagens reguladoras de umidade auxiliam a preservação da qualidade do alimento uma vez que mantêm a umidade ideal do produto ao longo de seu armazenamento. As embalagens promovem este efeito por meio da presença de um antiúmectante aplicado na própria embalagem do produto na forma de uma camada de material ou por uso de um sachê colocado na parte interna da embalagem. Normalmente faz-se uso de um material extremamente absorvente como os utilizados em bandejas de produtos cárneos resfriados (SUPPAKUL *et al.*, 2003).

Caso o antiúmectante seja adicionado às matérias-primas da embalagem e seja submetido ao processo de produção da mesma é importante que o ingrediente antiúmectante mantenha suas características após o processo produtivo para que seja eficaz. Além disso, caso o antiúmectante seja utilizado na embalagem secundária, a camada mais externa da embalagem secundária deve ter uma baixa permeabilidade ao

vapor de água de forma a impedir que o vapor de água do ambiente externo, migre para o interior da embalagem e seja absorvido pelo antiumedecante. A ação do antiumedecante deve estar focada na absorção da umidade da parte interna da embalagem de forma a manter as características do produto embalado (VERMEIREN *et al.*, 1999).

2.4.3 Embalagens ativas antimicrobianas

Embalagens antimicrobianas são consideradas promissoras uma vez que o ingrediente antimicrobiano não faz parte da formulação do alimento, o que pode comprometer as características sensoriais do mesmo dependendo do nível de uso necessário para que se atinja o efeito desejado. Além disso, as substâncias antimicrobianas, quando fazem parte do produto embalado, podem ser neutralizadas ou difundidas rapidamente no produto e terem o seu efeito reduzido (DEVLIEGHÈRE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004; HSIEH; MAU; HUANG, 2001; OUTATTARA; SABATO; LACROIX, 2001).

Aliado a este fato, o desenvolvimento de microrganismos aeróbios em alimentos se inicia ou é mais intenso na sua superfície, uma vez que durante a manipulação ou exposição do produto durante ou após sua produção, a contaminação pode ocorrer (QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

O objetivo do uso deste tipo de embalagem é a inibição do crescimento de microrganismos no produto embalado. Segundo Appendini e Hotchkiss (2002) as embalagens antimicrobianas podem ser encontradas de distintas formas, como segue:

2.4.3.1 Aplicação de antimicrobianos em sachês

Os ingredientes antimicrobianos estão presentes em sachês, que são parte da embalagem do produto. Os sachês podem estar soltos na embalagem ou aderidos à parte interna da mesma. Os componentes antimicrobianos voláteis são liberados e modificam a mistura gasosa interna da embalagem interferindo desta forma no desenvolvimento dos microrganismos no alimento.

2.4.3.2 Aplicação de antimicrobianos diretamente em polímeros

Ingredientes voláteis e não voláteis fazem parte da composição de polímeros e a ação antimicrobiana ocorre ou por meio das mudanças promovidas pelos componentes voláteis na mistura gasosa presente no interior da embalagem ou por meio do contato direto do produto alimentício com o antimicrobiano não volátil.

Para os compostos voláteis, sua liberação é principalmente controlada pela sua difusão através do polímero. Quando os compostos atingem a mistura gasosa presente entre o alimento e a embalagem, as substâncias atingem a superfície do produto onde são absorvidas e então se difundem pelo produto promovendo o efeito antimicrobiano (LOPEZ-RÚBIO *et al.*, 2004).

O estudo da velocidade de liberação destes compostos voláteis da embalagem para o *headspace* (espaço interno entre o produto e a embalagem) de forma a manter o alimento em constante e adequado contato com as substâncias é relevante para o potencial de inibição da embalagem antimicrobiana (BUONOCORE *et al.*, 2003).

Produtos cárneos, prontos para o consumo são bons exemplos de produtos que podem ser embalados com polímeros convencionais antimicrobianos nos quais o ingrediente antimicrobiano, presente no polímero, entra em contato com o produto e migra por difusão da embalagem para o produto (QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

Outro exemplo é a aplicação de uma camada de zeólitas em polímeros como o polietileno, polipropileno, nylon e estireno butadieno utilizados como embalagens de alimentos. Sabe-se que os íons de prata promovem inibição do crescimento de uma ampla gama de microrganismos e por isso os íons de cálcio presentes nas zeólitas são substituídos por íons de prata (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004).

2.4.3.3 Aplicação de antimicrobianos na superfície de polímeros

Neste caso, os polímeros recebem uma cobertura de filme antimicrobiano. Geralmente os antimicrobianos que não suportam as etapas de processamento

dospolímeros, são aplicados na superfície dos mesmos, após sua formação (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Labuza e Breene (1989) citaram em um de seus artigos sobre a comercialização pela empresa Union Carbide, de tripas destinadas a embalar mortadela adicionadas do antimicrobiano sorbato.

É importante também que os antimicrobianos se mantenham ativos quando aderidos ao polímero e que aditivos utilizados nos polímeros como os anti-embaçantes (*anti-fogs*), os lubrificantes, os plastificantes entre outros não afetem a ação do antimicrobiano. Além disso, a análise do efeito da adição dos antimicrobianos nas propriedades mecânicas, de barreira e óticas dos polímeros é relevante. Estas considerações devem ser feitas tanto no caso da adição de antimicrobianos aplicados na superfície de polímeros quanto no caso da adição direta no material polimérico (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

2.4.3.4 Imobilização de antimicrobianos em polímeros por meio de íons ou ligações covalentes.

Neste tipo de aplicação, o antimicrobiano não migra do polímero para o alimento pois está imobilizado na superfície do mesmo. A ação antimicrobiana se dá por meio do contato direto do ingrediente ativo com o alimento. Um exemplo deste tipo de embalagem, comercializada no Japão, é a aplicação de zeólitas com íons de prata na superfície de polímeros para obtenção de efeito antimicrobiano (LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2004).

2.5 Embalagens biodegradáveis

Os polímeros convencionais são amplamente utilizados pelas empresas produtoras de alimentos, porém possuem reciclagem custosa e considerável quantidade de energia para o seu processo é consumida. Aliado a este fato, a reciclagem é limitada uma vez que materiais plásticos não podem ser reciclados inúmeras vezes (AVELLA *et al.*, 2005; PARRA *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de embalagens biodegradáveis tem sido impulsionado pela necessidade de se reduzir os resíduos de embalagens produzidos pelo consumo de alimentos e de produtos em geral que causam impactos ao meio ambiente (GARCÍA *et al.*, 2004; JEREZ *et al.*, 2005; ROY *et al.*, 2000; VEIGA-SANTOS, 2004). Os materiais biodegradáveis são aqueles que podem ser degradados pela ação enzimática de organismos vivos tais como bactérias, leveduras e fungos (AVELLA *et al.*, 2005).

Biopolímeros como proteínas, carboidratos e lipídios têm sido utilizados para elaboração de embalagens biodegradáveis e para este tipo de material não há a necessidade do uso do processo de reciclagem ou queima. Desta forma, os problemas quanto à produção exagerada de resíduos e os riscos de poluição do meio ambiente são reduzidos (CANER; VERGANO; WILES, 1998; GARCÍA; MARTINO; ZARITZKY, 2000; LONGARES *et al.*, 2005; MALI *et al.*, 2002).

2.5.1 Tipos de embalagens biodegradáveis

Donhowe e Fennema (1994) indicam os possíveis usos destes materiais seja na forma de embalagens (chamados de filmes ou biofilmes) ou como coberturas (*coatings*) de alimentos. Entre os vários benefícios do uso destes materiais em alimentos podem-se destacar os descritos a seguir:

2.5.1.1 Retardar a migração de umidade

Os filmes ou coberturas podem ter efeito na perda ou ganho de umidade do alimento. Desta forma as características de textura, sabor e aparência são mantidas por período de tempo mais prolongado. Temos como exemplos os filmes utilizados entre a massa de pizza e o molho de tomate. O filme é utilizado de forma a evitar que a água presente no molho migre para a massa e conseqüentemente modifique a crocância característica da pizza (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

2.5.1.2 Retardar a migração de gases

Biofilmes podem ser utilizados de forma a retardar a transmissão ou absorção de gases entre o alimento e o ambiente externo. Absorção de oxigênio e dióxido de carbono são exemplos de gases que em geral devem ter sua migração controlada em produtos alimentícios de forma a evitar danos ou deteriorações indesejáveis (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

2.5.1.3 Retardar a migração de óleo, gordura ou solutos

Filmes biodegradáveis podem também ser usados para retardar a migração de óleos, gorduras e solutos de forma a evitar mudanças nas características dos alimentos embalados (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

2.5.1.4 Melhorar as propriedades de manuseio de produtos

Produtos alimentícios que são compostos de partículas ou pequenos pedaços como coberturas de pizzas, recheios entre outros podem ser beneficiados pelo uso de biofilmes uma vez que os biofilmes são capazes de manter o produto no devido lugar mesmo durante o transporte dentro da fábrica, na etapa de embalagem e na distribuição do mesmo (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

2.5.1.5 Liberar compostos voláteis

Os biofilmes podem também ser utilizados como veículos de aromas, ingredientes antimicrobianos, antioxidantes e corantes que serão liberados no alimento durante o armazenamento (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

2.5.2 Componentes dos biofilmes

Os componentes dos biofilmes podem ser divididos em categorias: a base de hidrocolóides, de lipídios ou de proteínas e o filme pode ser ainda classificado como compósito. Os hidrocolóides utilizados neste tipo de produto incluem os derivados de

celulose, alginatos, amidos e outros polissacarídeos. Os lipídios utilizados incluem os ácidos graxos, ceras e gliceróis. Os biofilmes compósitos são definidos como os materiais que agregam tanto hidrocolóides quanto lipídios ou outros compostos (DONHOWE; FENNEMA, 1994; BUTLER *et al.*, 1996).

Os biofilmes produzidos a base de amido têm sido desenvolvidos e estudados devido ao seu baixo custo e disponibilidade (MALI *et al.*, 2002; PARRA *et al.*, 2004; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2005). O amido é composto de duas frações: a amilose, formada por cadeias de glicose lineares e amilopectina, formada por cadeias ramificadas de glicose (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

2.5.3 Propriedades dos biofilmes

As propriedades de barreira ao vapor de água, ao oxigênio, propriedades mecânicas e ópticas apresentam em geral características distintas dependendo do composto utilizado como base do biofilme. A melhoria das propriedades de embalagem dos biofilmes tem sido objetivo de estudos. O uso de distintos plastificantes e de misturas entre biomoléculas tem mostrado que as características de resistência à tração, alongamento e propriedades de barreira podem ser incrementadas (BUTLER *et al.*, 1996; LONGARES *et al.*, 2005; MALI *et al.*, 2002; PARRA *et al.*, 2004; RHIM *et al.*, 1998; VEIGA-SANTOS, 2004).

Longares *et al.* (2005) elaboraram e caracterizaram filmes de proteína isolada de soro de leite (WPI) e caseinato de sódio. A caracterização foi realizada por meio de análises das propriedades físicas, de barreira e da solubilidade dos biofilmes. O estudo foi motivado pelo fato de que o uso de filmes em sistemas alimentícios pode ser limitado pelo efeito dos biofilmes na modificação da textura do alimento. A espessura do biofilme e a solubilidade do mesmo, ao ser ingerido junto com o alimento, influenciam a percepção do consumidor quanto à alteração da textura. Portanto, o biofilme deve ser solubilizado facilmente ao ser ingerido e deve ter espessura menor possível. Aliado a estas características deve apresentar valores aceitáveis quanto às propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. No estudo citado, várias proporções de proteína isolada de soro de leite (WPI) e caseinato de sódio foram testadas. No estudo,

glicerol foi utilizado como plastificante e a proporção entre este ingrediente e a proteína utilizada (WPI) ou o caseinato de sódio variou de acordo com o planejamento definido para o estudo. Filmes contendo somente WPI e glicerol ou somente caseinato de sódio e glicerol também foram elaborados. Como resultado obteve-se a informação de que a resistência à tração e a permeabilidade ao vapor de água de filmes elaborados com misturas de WPI e caseinato de sódio foram similares às propriedades de filmes elaborados somente com caseinato de sódio. Filmes contendo somente WPI e glicerol como plastificante apresentaram melhores resultados quanto ao alongamento do que filmes com misturas entre este ingrediente e caseinato de sódio. Aumento na concentração de caseinato de sódio de 25 a 100% aumentou significativamente a solubilidade dos filmes que indica que a aplicação de filmes a base de proteína em alimentos poderá ser estendida.

Parra *et al.* (2004) avaliaram o efeito dos plastificantes glicerol (GLY) e polietileno glicol (PGE) e do aditivo responsável por promover ligações cruzadas glutaraldeído (GLU), em filmes contendo fécula de mandioca como base. A avaliação foi realizada por meio dos resultados de análises de propriedades mecânicas (resistência máxima à tração e porcentagem de alongamento) e propriedades de barreira ao vapor de água (taxa de permeabilidade ao vapor de água). Modelos preditivos indicaram que filmes elaborados com polietileno glicol (PGE) em concentração acima de 0,3 g (em 100 mL de água e 1 g de fécula de mandioca) exibiram boa porcentagem de alongamento na ruptura. Filmes com 1 g de glicerol (em 100 mL de água e 1 g de fécula de mandioca) apresentaram os menores valores de taxa de permeabilidade ao vapor de água; a adição de valores acima de 0,5 g de glutaraldeído, nas mesmas condições, foi responsável pelos menores valores de permeabilidade medidos para os biofilmes confirmando o efeito de promover ligações cruzadas deste ingrediente. Sugere-se que cada tipo de filme, dependendo da composição, terá resultados promissores em determinados tipos de sistemas.

Veiga-Santos (2004) avaliou o efeito da adição dos plastificantes sacarose, açúcar invertido e fosfato de sódio em biofilmes a base de fécula de mandioca, nas propriedades de barreira ao vapor de água e oxigênio, propriedades mecânicas (resistência máxima à tração e porcentagem de alongamento) e propriedades térmicas

(calorimetria exploratória diferencial ou DSC e termogravimétrica ou TGA). Os biofilmes foram elaborados somente com estes ingredientes ou com combinações entre eles. Como parte das conclusões do estudo tem-se que os ingredientes utilizados afetaram de forma negativa e significativa ($p < 0,05$) os resultados da resistência máxima à tração, porém impactaram positivamente na porcentagem de alongamento na ruptura. Os valores de permeabilidade ao vapor de água não variaram estatisticamente com a adição dos ingredientes estudados.

2.6 Embalagens biodegradáveis antimicrobianas

Filmes biodegradáveis são possíveis meios de agregação de ingredientes com o objetivo de melhorar a textura, o aroma, o controle do crescimento microbiano e a qualidade geral de alimentos (CUPPET, 1994).

A inibição do crescimento de bolores em pães, por meio do uso de embalagens biodegradáveis antimicrobianas foi estudada por Soares *et al.* (2002). Filmes de acetato de celulose contendo 0%, 2% e 4% do antifúngico propionato de sódio foram produzidos. Para que o efeito antimicrobiano do propionato, quando adicionado nos filmes fosse avaliado, pães tipo forma foram produzidos. As amostras utilizadas para análise foram compostas de três fatias do pão empilhadas, com amostras de filmes entre uma fatia e outra (9 X 9 centímetros) O conjunto foi embalado em sacos de polietileno de baixa densidade (60 μm) e fechados com um arame. O armazenamento foi realizado sob temperatura de 25 °C (± 2 °C) por quinze dias. O controle foi composto de amostras de pão (três fatias) sem a presença de amostras de biofilme. Somente a fatia interna do conjunto das 3 fatias foi utilizada na preparação das amostras para avaliação microbiológicas. Diluições de 10^{-1} a 10^{-5} foram preparadas, as alíquotas foram inoculadas em placas de petri (triplicata) com o meio de cultura *Potato dextrose agar* e mantidas a 25 °C por 5 dias. Após este período, a contagem das colônias presentes foi realizada. Como conclusão do trabalho obteve-se que a adição de 4% de propionato de sódio nos filme foi capaz de reduzir por volta de 70% o número de bolores na amostra de pão em contado com esta embalagem quando comparado com o crescimento ocorrido em amostras de pão embaladas com filmes sem o ingrediente

antifúngico. Os resultados do número de microrganismos em amostras de pão com filme sem adição de antimicrobiano e sem filme algum, indicaram que com a presença do filme a população microbiana foi maior o que, segundo os autores do trabalho pode ser justificado pela possibilidade neste caso, de entrada de ar entre uma fatia e outra, possibilitando o crescimento de bolores. Este fato, segundo os autores, não ocorreu quando as fatias foram embaladas unidas como nas amostras preparadas sem a presença de filme. As análises de atividade de água, pH e umidade das amostras de pães foram realizadas em distintos períodos do armazenamento (14 dias). Os valores não apresentaram grande variação em cada período de armazenamento, para cada filme testado.

Apesar da demanda crescente do uso de ingredientes naturais em alimentos (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2005; GUYNOT *et al.*, 2005, RHIM *et al.*, 1998), existem poucos relatos em literatura sobre o efeito de ingredientes antimicrobianos naturais, quando aplicados em biofilmes (DURANGO; SOARES; ANDRADE, 2006; PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005; SEYDIM, SARIKUS, 2006).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de orégano, alecrim e alho tiveram seu efeito expresso quando adicionados em biofilmes à base de proteína isolada de soro de leite, segundo estudo realizado por Seydim e Sarikus (2006). Os óleos essenciais, em concentração de 1 a 4% (isoladamente), foram adicionados aos biofilmes. Discos de cada biofilme, com diâmetro definido, foram posicionados em meios de cultura previamente inoculados com 200 µL de solução com 10⁸ UFC/mL de cada um dos microrganismos utilizados no estudo (*Escherichia coli* O157:H7), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (NCTC 2167) e *Lactobacillus plantarum* (DSM 20174). O efeito da presença dos biofilmes antimicrobianos no meio de cultura foi avaliado a partir do tamanho da zona de inibição formada após o período de incubação necessário.

Biofilmes com adição de óleo de alecrim não promoveram inibição de nenhum dos microrganismos estudados em nenhuma das dosagens utilizadas para o óleo. O óleo de alho obteve seu efeito antimicrobiano expresso quando aplicado nos biofilmes em dosagens iguais ou acima de 2% da composição do biofilme. Os com óleo essencial de orégano foram os que promoveram resultados mais expressivos no crescimento das

colônias. A partir de 2% de adição o efeito já foi verificado em todos os microrganismos avaliados. A zona de inibição observada aumentou com o aumento da concentração do óleo essencial e seus valores foram sempre superiores aos encontrados para todos os óleos essenciais avaliados, nas mesmas dosagens.

Pranoto, Salokhe e Rakshit (2005) realizaram estudo do efeito de óleo de alho quando aplicado em biofilmes à base de alginatos. Estudou-se o efeito do óleo de alho na inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e também nas propriedades mecânicas e físicas dos biofilmes. Os autores realizaram inicialmente a avaliação do efeito da adição do óleo de alho *in vitro*. Uma alíquota do óleo de alho foi previamente diluída com etanol e depois misturada a um caldo nutritivo e a cada um dos microrganismos a serem estudados. Após procedimento de incubação definido, uma alíquota foi utilizada para preparação de diluições e as mesmas foram posteriormente inoculadas em placas com o meio de cultura *Tryptic soy agar*. A presença de 0,1% v/v do óleo no caldo nutritivo reduziu a contagem de células viáveis de todas as bactérias estudadas em relação aos controles utilizados (preparados com etanol ao invés do óleo). Para o estudo do efeito da adição do óleo de alho quando adicionado em filmes à base de alginatos, biofilmes foram elaborados com adição do óleo, previamente diluído com etanol, até o limite máximo de 0,4% (v/v) da formulação total do biofilme. Uma amostra de cada biofilme antimicrobiano, com diâmetro de 17 milímetros, foi cortada e posicionada em placas de petri com o meio de cultura *Mueller Hinton agar*. Os mesmos já haviam sido inoculados com 10^5 - 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL) de cada bactéria estudada. A incubação deu-se por 24 horas sob temperatura de 37 °C. O diâmetro da zona de inibição formada ao redor do filme antimicrobiano foi usado como meio de avaliação da inibição promovida. Os filmes estudados apresentaram efeito antimicrobiano, sob as condições testadas, nas bactérias *Staphylococcus aureus* (acima de 0,2% (v/v) adicionado) e *Bacillus cereus* (acima de 0,1% (v/v)). A resistência à tração dos biofilmes diminuiu significativamente com valores acima de 0,3% (v/v) de adição do óleo de alho e a porcentagem de alongamento na ruptura foi reduzida somente com adição de 0,4% (v/v). A permeabilidade ao vapor de

água manteve-se estatisticamente igual com adição de 0% até 0,3% de óleo e apresentou valores maiores quando a adição foi de 0,4% (v/v).

Durango, Soares e Andrade (2006) utilizaram coberturas (*coating*) produzidas à base de quitosana e amido de inhame em cenouras minimamente processadas para avaliar o efeito da presença destas coberturas como proteção ao desenvolvimento microbiano. Quatro filmes biodegradáveis antimicrobianos foram analisados quanto ao seu efeito nas propriedades microbiológicas das cenouras. Um deles foi elaborado com 4% de amido de inhame, os outros dois tinham 4% de amido de inhame e quitosana nas proporções de 0,5% e 1,5%. Quantidade fixa de 2% de glicerol foi utilizada nos três biofilmes citados anteriormente. Biofilme controle (somente com amido de inhame) foi elaborado também. As avaliações foram realizadas em cenouras cobertas (após imersão nas suspensões dos biofilmes) ou não cobertas após período de estocagem a 10 °C de 0, 5, 10 e 15 dias, embaladas em sacos de policloreto de vinila (PVC). Como parte da conclusão do trabalho, os resultados indicaram que a adição de 1,5% de quitosana nos filmes utilizados como cobertura inibiu totalmente o crescimento de coliformes e bactérias ácido lácticas, que foram dois dos microrganismos estudados, por todo o período de estocagem considerado.

A combinação do efeito de baixas doses de irradiação e utilização de biofilmes antimicrobianos foi avaliada por Ouatarra, Sabato e Lacroix (2001) em camarões (*Penaeus spp.*) pré-cozidos. Suspensões de biofilmes antimicrobianos foram elaboradas com adição de distintas concentrações de óleo de tomilho e trans-cinamaldeído em formulações a base de proteína isolada de soja e proteína isolada de soro de leite.

Amostras de camarões pré-cozidos foram imersos nas suspensões dos biofilmes e após drenagem do excesso da cobertura, os mesmos foram submetidos à irradiação com raios gama na dose de 3 kGy. Amostras de camarões pré-cozidos imersos em solução contaminada com *Pseudomonas putida* (aproximadamente 10^5 UFC/ mL) foram preparadas e seguiu-se o mesmo procedimento descrito para as amostras sem contaminação descritas anteriormente. Todas as amostras, irradiadas e os controles (sem irradiação e / ou cobertura) foram armazenadas a 4°C e avaliadas quanto a microrganismos mesófilos aeróbios (APC) e *Pseudomonas putida* após 1, 3, 6, 9, 14 e

21 dias de estocagem. O efeito sinérgico entre irradiação e o uso de biofilmes antimicrobianos como coberturas foi analisado, sendo a vida de prateleira dos produtos nestas condições a maior observada. Após 21 dias de estocagem (tempo final definido para a realização de avaliações microbiológicas) os produtos que foram submetidos às duas técnicas ainda não haviam atingido valores de 10^7 UFC/g, valor limite considerado para término da vida de prateleira do produto. As características sensoriais de cor, sabor e aparência dos produtos somente irradiados foram mantidas, porém o uso de biofilmes com adição de óleo de tomilho e trans-cinamaldeído afetaram negativamente a aceitação sensorial dos produtos.

2.7 Produtos de panificação

A indústria da panificação está entre os seis maiores segmentos industriais do Brasil. Existem estimativas que indicam que o consumo per capita de pão por ano no país está em torno de 33 kg. Este número representa um valor baixo se comparado com a quantidade recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que é de 60 kg. Se o consumo no Brasil for comparado com o de outros países da América do Sul, os valores ainda são baixos uma vez que o argentino consome 73 kg de pão por ano e o chileno consome 93 kg (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO E CONFEITARIA, 2006).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou o “Regulamento Técnico para Produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos” e nesta resolução os produtos de cereais são classificados em massas alimentícias, pães, biscoitos e cereais processados (BRASIL, 2005).

Os ingredientes mais utilizados em panificação são a farinha de trigo, a gordura, o sal, o fermento, o açúcar, o leite em pó e os micro ingredientes ou coadjuvantes de fabricação. São chamados desta forma, pois são utilizados em pequenas quantidades e auxiliam na obtenção de produtos finais com a qualidade desejada. Em produtos de panificação, a farinha é o ingrediente presente em maior quantidade e considerado a base da formulação, é inclusive utilizada como referência para os cálculos das quantidades dos demais ingredientes (CAUVAIN, 1998; CARVALHO JR., 2001).

Segundo Carvalho Jr. (2001), os alicerces da panificação tradicional são a formulação do produto, a farinha de trigo, os demais ingredientes utilizados na formulação e o processo produtivo. A Tabela 2.1 indica as sugestões de porcentagens dos ingredientes mais utilizados em alguns pães de acordo com o autor.

Tabela 2.1 - Sugestões de quantidade dos ingredientes mais utilizados em formulações de pães, segundo Carvalho Jr. (2001).

Ingredientes	Pão Francês ¹	Pão de Forma ¹	Pão Doce ¹
Farinha de trigo	100,0	100,0	100,0
Água	58,0 – 62,0	56,0 – 60,0	42,0 – 54,0
Sal	2,0	2,0	2,0
Fermento Instantâneo	1,0	1,2 – 1,5	1,5
Açúcar	0,0 -1,0	3,0- 8,0	8,0 – 20,0
Gordura	0,0 – 1,0	2,0 – 6,0	2,0 – 10,0
Leite em pó	0,0	0,0 – 4,0	0,0 – 4,0
Melhorador ²	1,0	0,5 – 1,0	0,80 – 1,0

¹ Porcentagem em relação à porcentagem de farinha de trigo.

² Melhorador: mistura de aditivos como emulsificantes, enzimas e ácido ascórbico.

O processo de fabricação de pães inclui a etapa de forneamento, onde temperaturas elevadas são utilizadas e desta forma o pão imediatamente após o forneamento não apresenta contaminação microbiana importante (PATERAS, 1998).

As etapas posteriores ao forneamento (resfriamento, embalagem, armazenamento) podem favorecer o crescimento de microrganismos como: os relacionados à exposição do produto forneado ao ar contaminado por um período de tempo prolongado; por contaminações existentes na fatiadora de pães ou utensílios utilizados na embalagem ou corte; na embalagem do produto em sacos plásticos quando o mesmo ainda apresenta temperatura alta provocando condensação de vapor sobre o mesmo e conseqüente crescimento de fungos na superfície e; ainda durante o

armazenamento dos produtos sob condições de temperatura e umidade elevadas (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Quanto às propriedades físico-químicas temos que em geral os pães apresentam umidade em torno de 40%, atividade de água em torno de 0,95 e devido a estas características o crescimento de fungos é a maior causa de sua deterioração (FARKAS, 1997; NIELSEN, RIOS, 2000). Apesar de ser menos comum, o crescimento da bactéria *Bacillus subtilis*, que é termoestável, pode ocorrer em ambientes muito quentes e úmidos (umidade relativa acima de 90%) e ocasionar o problema conhecido como *rope*. O desenvolvimento desta bactéria promove no miolo dos pães aspecto de corda e a contaminação pode atingir os equipamentos e utensílios sendo então necessária a desinfecção geral do local produtivo (CARVALHO JR., 2001; PATERAS, 1998).

Os principais fungos que se desenvolvem em pães são o *Rhizopus nigricans* cujo micélio é de cor branca e possui aspecto “algodonoso”, o *Penicillium expansum* ou *Penicillium stoloniferum* cujos esporos são de cor verde, o *Aspergillus niger*, que possui coloração variando de esverdeado a marrom e preto e que produz um pigmento amarelo que se difunde no pão e *Monilia* que possui cor rosada (FRAZIER; WESTHOFF, 1993; PYLER, 1988).

O “Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos” (BRASIL, 2001) apresenta como limites para os aspectos microbiológicos de produtos de cereais os valores mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Contagem máxima permitida pela legislação brasileira (ANVISA) relativa aos padrões microbiológicos de produtos de cereais (BRASIL, 2001).

Microrganismo	Contagem máxima (UFC) ²
Coliformes a 45 ^o C em 1g de amostra ¹	10 ²
Samonella sp em 25 g de amostra	Ausência

¹ O mesmo que coliformes de origem fecal.

² Unidades formadoras de colônia.

Em geral, para que o crescimento de microrganismos em pães seja inibido, têm-se utilizado ingredientes químicos como os sorbatos e propionatos. Normalmente os

sorbatos são utilizados na forma de ácido sórbico o qual é aspergido na superfície do pão antes da embalagem em sacos plásticos ou outros materiais. O propionato possui um baixo poder de inibição do crescimento de leveduras e por isso pode ser adicionado na massa de pão sem interferir de forma demasiada no crescimento da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). O poder inibitório do propionato varia de acordo com o pH do alimento e é diminuído com um aumento do mesmo, sendo sua eficácia ótima atingida na faixa de pH entre 5 e 6 (DAVIDSON, 1997; FRAZIER; WESTHOFF, 1993; CARVALHO JR., 2001; NIELSEN; RIOS, 2000).