

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**GABRIEL JOSÉ COUTO**

**FILME BIODEGRADÁVEL CONTENDO NISINA E ÓLEO ESSENCIAL DE  
CARDAMOMO CONTRA *Staphylococcus aureus***

**LONDRINA  
2023**

**GABRIEL JOSÉ COUTO**

**FILME BIODEGRADÁVEL CONTENDO NISINA E ÓLEO ESSENCIAL DE  
CARDAMOMO CONTRA *Staphylococcus aureus***

**Biodegradable film containing bacteriocin and cardamom essential oil against  
*Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao curso de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

**Orientador(a):** Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia

**LONDRINA  
2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**GABRIEL JOSÉ COUTO**

**FILME BIODEGRADÁVEL CONTENDO NISINA E ÓLEO ESSENCIAL DE  
CARDAMOMO CONTRA *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título de  
Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em  
Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

Data de aprovação: 13/junho/2023

---

Luciana Furlaneto Maia  
Doutora em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Juliany Piazzon Gomes  
Mestre em Ciência de Alimentos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Marianne Ayumi Shirai  
Doutora em Ciência de Alimentos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**LONDRINA  
2023**

## RESUMO

Nos últimos anos, pode-se observar um aumento na busca por alimentos saudáveis e seguros, com menor quantidade de aditivos químicos, devido à preocupação com a conservação dos alimentos, diminuição e controle de microrganismos patógenos a saúde. Com isso, desenvolveram-se as embalagens ativas biodegradáveis, que tem por finalidade atuar como barreira a agentes externos e proporcionar a conservação do alimento a partir do uso de antimicrobianos como bacteriocinas e óleos essenciais. Este trabalho teve como finalidade a produção de um filme biodegradável à base de fécula de mandioca, acrescido com nisina e óleo essencial de cardamomo, a fim de desenvolver uma embalagem ativa, para promover inatividade microbiana do microrganismo *Staphylococcus aureus*. A produção do filme seguiu 4 protocolos com quantidades variadas de amido de mandioca, tendo como agente plastificante a glicerina. O óleo de cardamomo e a nisina foram adicionados na proporção de 5 mL e 5%, respectivamente. A formação do filme foi pela técnica de *casting*. A atividade antimicrobiana do filme foi testado em superfície do meio de cultura inoculado da bactéria *S. aureus* e realizado o teste de curva de morte em cultura líquida. Foram realizados os testes de inchaço, transparência biodegradação. Os resultados foram positivos em relação as análises realizadas, como atividade antimicrobiana do filme contra *S. aureus*, através de halos de inibição e juntamente com a curva de morte bacteriana, foi possível detectar que ao longo da exposição da bactéria com o filme antimicrobiano, a atividade do microrganismo foi inibida. Biodegradação positiva, pois após 20 dias exposto ao ambiente, teve sua degradabilidade completa, restando apenas alguns fragmentos. No teste de transparência que foi executado de forma visual, foi possível determinar características semelhantes ao desejado, mas ao ser acrescido com nisina e cardamomo teve sua cor alterada, mas ainda, possuindo resistência a manipulação e sem fissuras. Outro resultado positivo foi no teste de inchaço, o qual controle apresentou maior retenção de água do que o filme acrescido. Portanto, é possível concluir que o filme biodegradável acrescido com nisina e óleo essencial de cardamomo, obteve resultados positivos, inibindo significativamente a ação do patógeno alimentar, possuindo características de transparência, inchaço e biodegradabilidade adequadas e podendo então ser uma alternativa para indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** *Elettaria cardamomum*; bacteriocina; estafilococos coagulase positivo; amido de mandioca

## ABSTRACT

In recent years, it can be observed an increase in the search for healthy and safe foods, with less chemical additives due to the concern with food conservation, reduction and control of microorganisms that are pathogens to health. As a result, biodegradable active packaging was developed, which aims, in addition to the barrier ability, to provide food conservation from bacteriocins and essential oils, consequently extending the shelf life of the food. Therefore, this work aimed as finality to produce a biodegradable film based on cassava starch, added with nisin and cardamom essential oil, in order to develop an active packaging, in order to promote microbial inactivity of the microorganism *Staphylococcus aureus*. The production of the film followed 4 protocols with varying amounts of cassava starch, with glycerin as a plasticizing agent. Cardamom oil and nisin were added at 5 mL and 5%, respectively. The formation of the film was based on the casting technique. The antimicrobial activity of the film was tested on the surface of the inoculated culture medium of the bacteria *S. aureus* and the death curve test was performed in liquid culture. Swelling, transparency and biodegradation tests were carried out. We obtained positive results in relation to the analyzes carried out, such as the antimicrobial activity of the film against *S. aureus*, through inhibition halos and together with the bacterial death curve, it was possible to detect that during the exposure of the bacteria with the antimicrobial film, the activity of the microorganism was inhibited. Positive biodegradation, because after 20 days exposed to the environment, it had its complete degradability, leaving only a few fragments. In the transparency test, which was performed visually, it was possible to determine characteristics similar to what was desired, but when added with nisin and cardamom, it had its color changed, but still, having resistance to manipulation and without cracks. Another positive result was in the swelling test, which control showed greater water retention than the added film. Therefore, it is possible to conclude that the biodegradable film added with nisin and cardamom essential oil obtained positive results, significantly inhibiting the action of the food pathogen, having characteristics of transparency, swelling and adequate biodegradability and thus being able to be an alternative for the food industry.

**Keywords:** *Elettaria cardamomum*; bacteriocin; coagulase positive; Staphylococci cassava starch

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	9
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	9
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Filmes Biodegradáveis</b>	<b>10</b>
3.2. <i>Bacteriocinas</i>	12
3.3. <i>Cardamomo como agente Antimicrobiano</i>	13
3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1. <i>Amido de Mandioca</i>	16
4.2. <i>Microrganismo</i>	16
4.3. <i>Reativação dos Isolados</i>	16
4.4. <i>Teste Antimicrobiano do Óleo de Cardamomo e Nisina</i>	16
4.5. <i>Desenvolvimento do Filme Biodegradável de Amido Contendo Nisina e Óleo de Cardamomo</i>	17
4.6. <i>Atividade Microbiana do Filme Biodegradável Contra S. aureus</i>	18
4.7. <i>Biodegradação do Filme</i>	18
4.8. <i>Teste do Intumescimento</i>	19
4.9. <i>Transparência do Filme</i>	19
4.10. <i>Curva de Morte</i>	19
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>20</b>
5.1. <i>Teste Antimicrobiano do Óleo de Cardamomo e Nisina</i>	20
5.2. <i>Desenvolvimento do Filme Biodegradável de Amido Contendo Nisina e Óleo de Cardamomo</i>	21
5.3. <i>Atividade Microbiana do Filme Biodegradável Contra S. aureus</i>	22
5.4. <i>Biodegradação do Filme</i>	23
5.5. <i>Transparência do Filme</i>	24
5.6. <i>Teste de Intumescimento do Filme Biodegradável</i>	25
5.7. <i>Curva de Morte</i>	25
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIA</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Com o constante crescimento do interesse dos consumidores, por uma alimentação saudável, segura e com menor quantidade de aditivos químicos, a indústria foi forçada a investir em tecnologia para desenvolver produtos e embalagens com propósitos diferentes. Outra preocupação eram as doenças transmitidas por alimentos (DTA) e como eliminá-las. As DTA são conferidas à ingestão de alimentos ou água contaminados, sendo causadas por agentes físicos, químicos ou biológicos (BRASIL, 2010).

Nos últimos anos, abundantes sistemas de embalagens estão sendo desenvolvidas com o propósito de interagir de forma desejável com o alimento. Os mesmos são denominados de embalagens ativas e/ou inteligentes, sendo importantes para a conservação de alimentos. Nestas embalagens há uma relação entre o filme e alimento, em que as funções desse sistema vão além das habilidades de barreira contra o ambiente externo ao produto (MULLER, 2016).

Filmes biodegradáveis são aqueles de origem natural, e que apresentam taxa de biodegradação apropriada, desenvolvidos através de produtos como milho, celulose, batata ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas (ASTM, 1999). As embalagens ativas podem ser compostas com diversos aditivos naturais como óleos essenciais extraídos de sementes, como por exemplo, o cardamomo ou por bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos ativos sintetizados e secretados por bactérias nos ribossomos (ASTM, 1999).

As bacteriocinas atuam na membrana citoplasmática, permeabilizando as membranas das células sensíveis por meio da formação de poros, causando o desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato (OGAKI et al., 2015).

Os filmes antimicrobianos têm a liberação controlada do aditivo antimicrobiano garantindo a segurança alimentar para o consumidor, pois não são adicionados diretamente no alimento. Os aditivos estão presentes em menores quantidades, e apenas onde sua presença é requerida, a saber, na superfície do produto, onde a maior parte das reações de deterioração ocorre (ROSA; BERNADETTTER, 2022).

Portanto, a adição dessas bacteriocinas ou óleos essenciais em filmes biodegradáveis garante uma redução ou inibição de patógenos alimentares, prolongam a vida útil do alimento, trazendo consigo propriedades para proporcionar

um alimento seguro e conseqüentemente mais saudável (ROSA; BERNADETTTER, 2022).

Em vista disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver um filme biodegradável antimicrobiano, sintetizado através de fécula de mandioca, acrescido com bacteriocina e óleo essencial de cardamomo, com a finalidade de produzir um filme com propriedades para garantir um alimento seguro, livre de patógenos ou deterioradores alimentares, prolongar a vida útil do alimento e oferecer uma alternativa para filmes de fontes não renováveis, causando severos impactos ambientais.



## 2. OBJETIVO

Produzir filme biodegradável, antimicrobiano, à base de amido contendo nisina e óleo essencial de cardamomo.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver filme biodegradável de amido de mandioca contendo nisina utilizando a técnica de *casting*;
- Elaborar filme biodegradável de amido de mandioca contendo óleo de cardamomo utilizando a técnica de *casting*;
- Elaborar filme biodegradável de amido de mandioca contendo nisina e cardamomo utilizando a técnica de *casting*.
- Testar atividade antimicrobiana dos filmes biodegradáveis formados contra *S. aureus*, por meio da técnica disco difusão;
- Analisar as propriedades de biodegradação dos filmes biodegradáveis formados, simulando condições naturais de degradação do solo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente seção traz um compilado sobre o tema abordado na literatura, focando na apresentação da importância de filmes antimicrobianos acrescidos de óleos essenciais no controle de patógenos alimentares.

#### 3.1. Filmes Biodegradáveis

De acordo com Friedrichsen et al. (2022) nos dias atuais há uma crescente busca pela substituição de plásticos sintéticos por polímeros naturais, como os polímeros biodegradáveis, tornando-se uma tendência na indústria.

Grande parte dos filmes biodegradáveis são produzidos a partir de materiais biológicos, como polissacarídeos, proteínas, lipídios e derivados, como exemplo milho, celulose, batata, mandioca ou serem gerados por bactérias e até mesmo derivados de fonte animal, como a quitina e entre outras proteínas (RAY, 2005). O desenvolvimento dos filmes inclui agentes de formação de película, solventes e plastificantes, entre outros reagentes. Também podem ser adicionados alguns aditivos durante a formulação dos filmes para apresentar propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Segundo Gomes (2022), a produção dos filmes por casting baseia-se na solubilização ou dispersão dos biopolímeros ou agentes filmogênicos em um solvente, podendo estes ser água ou solventes orgânicos, acrescidos de plastificantes como a glicerina. Após este preparo, estas coberturas são transferidas para um suporte e secas.

Bangar et al. (2022) diz que devido à alta disponibilidade e preço baixo, o amido é considerado uma matéria-prima propícia para obtenção de filmes. Outras características importantes como capacidade de gelatinização, o que torna o amido em material termoplástico, alta taxa de degradabilidade, fácil processamento, incolor, inodoro e insípido tornam essa matéria prima relevante para produção de filmes.

É importante ressaltar que existem diversos tipos de amido (féculas), entre eles se destaca a fécula de mandioca, que são considerados de alta expansão, pois seus grânulos quando submetidos ao processo de aquecimento em água, incham em grande proporção, apresentando alta viscosidade, gerando filme com flexibilidade, espessura fina e transparentes (AJOUMAN et al., 2018).

Sueiro et al. (2016) relatam que a fécula de mandioca pode apresentar algumas desvantagens na produção de filmes, como por exemplo, baixa resistência a umidade de armazenamento e propriedades mecânicas. O amido pode ser misturado a outros agentes plastificantes como a glicerina, para então tentar reduzir essas desvantagens.

Portanto, a utilização de filmes biodegradáveis é vantajosa devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade no mercado, suas características físico-químicas também colaboram para o desenvolvimento de embalagens ativas, além de colaborar na redução do uso de fontes não renováveis e reduzir a quantidade de lixo através da reciclagem biológica, no qual os resultados da biodegradação do filme.

### 3.1.1. Filmes Biodegradáveis Antimicrobianos

A ampliação da exigência do consumidor por alimentos naturais e saudáveis gera a consequência que as indústrias de alimentos se transformem, investindo em pesquisas e tecnologias avançadas. Embalagens ativas com potencial antimicrobiano possui algum agente incorporado ou imobilizado no material, que possuem tal capacidade, tornando um material com maior proteção, inibindo ou eliminando microrganismos patogênicos (Garcia, 2016).

Segundo Muller (2016), vários aditivos podem ser incorporados nestas embalagens a fim de aumentar a vida útil dos alimentos, sendo a maior parte os conservantes antimicrobianos, capazes de prevenir o desenvolvimento de patógenos e deterioradores alimentares.

A liberação controlada do aditivo antimicrobiano garante a segurança alimentar para o consumidor, pois não são adicionados diretamente no alimento. Com isso, estão presentes em menores quantidades, e apenas onde sua presença é requerida, a saber, na superfície do produto, onde a maior parte das reações de deterioração ocorre (MULLER, 2016).

Farias (2016) relatou estudos sobre atividade antimicrobiana de óleos essenciais, incorporando-os nos filmes, promovendo maior vida útil aos alimentos e controle microbiológico. Conforme Dória e D'arce (2000) diversas especiarias tem sido exploradas como agentes inibitórios de patógenos alimentares, acrescentadas em filmes biodegradáveis, como óleo essencial de alecrim.

Portanto, filmes com propriedades antimicrobianas são capazes de inibir ou retardar crescimento microbiano ou de agentes deterioradores de alimentos, trazendo habilidades e inovação para embalagens de fontes renováveis, garantindo um alimento seguro e reduzindo o lixo através da reciclagem biológica.

### 3.2. Bacteriocinas

As técnicas de conservação de alimentos geralmente podem prevenir a contaminação dos alimentos; além disso, várias cepas patogênicas já foram relatadas a partir de alimentos biopreservados. Sendo assim, é importante a busca por novas técnicas de conservação.

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos biologicamente ativos sintetizados e secretados por bactérias nos ribossomos (OGAKI; FURLANETO, 2015). Esse peptídeo tem propriedades bactericidas contra diversas espécies, incluindo bactérias e leveduras (MARTÍNEZ; TREVIÑO; SALAS 2003). Muitas espécies de bactérias lácticas são produtoras de bacteriocinas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) (MCMULLEN; STILES, 1996).

De acordo com Rosa e Franco (2002), a nisina, gerada por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem caracterizada atualmente, ela bloqueia o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas e patógenos como *Listeria monocytogenes*.

A ação das bacteriocinas, como a nisina, ocorre na membrana citoplasmática (MONTVILLE e CHEN, 1998). Dependendo de sua concentração, a nisina apresenta efeito bactericida ou bacteriostático e atua permeabilizando as membranas das células sensíveis por meio da formação de poros, causando o desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato (ROSA; FRANCO,2002), deixando as células sem energia suficiente para realizar atividades.

Segundo Moreno et al. (2000) a atividade biológica, solubilidade e estabilidade da nisina estão diretamente ligadas ao pH, temperatura e tipo de substrato. Bower et al. (2002) cita que a nisina apresenta estabilidade à tratamentos térmicos, tratamentos de alta pressão e à meios ácidos.

### 3.3. Cardamomo como agente antimicrobiano

A constante resistência de microrganismos aos aditivos químicos usuais tem expandido a cada ano, mostrando-se ainda mais fortificado, gerando-se a necessidade de utilização de meios naturais e inovadores. Portanto, o uso de extratos de óleos essenciais vegetais tem se mostrado conveniente ao controle destes microrganismos infecciosos de alimentos, pois eles apresentam diversas características antimicrobianas que podem ser aproveitadas.

Os óleos essenciais (OE), também chamados de óleos voláteis, são produtos do metabolismo secundário das plantas aromáticas, possuidoras de ação antibacteriana, antioxidante e flavorizante.

O cardamomo é uma planta herbácea pertencente à família Zingiberaceae, comumente cultivado no sul da Índia, Sri Lanka, Tanzânia e Guatemala (Figura 1). A semente de *E. cardamomum* é composta por compostos fitoquímicos como esteróis, ácidos fenólicos, lipídios, amido, flavonóides, proteínas e óleo essencial (SEPÚLVEDA, 2020).

Na Índia, *Elettaria cardamomum* é usado para muitas condições, incluindo asma, bronquite, cálculos renais, anorexia, debilidade geral e distúrbios do trato urinário. De acordo com Sepulveda (2020) além disso, estudos revelaram a eficácia desta planta como agente anticancerígeno, antimicrobiano e anticonvulsivante.

**Figura 1 – Planta e semente de *Elettaria cardamomum***



Autor: Karen Goldamn, disponível em: <https://www.eucomosim.com/especial-tudo-sobre-o-cardamomo/>

O óleo essencial de cardamomo é extraído das sementes e possui como composto majoritário o 1,8-cineole, também conhecido como eucaliptol, na concentração de 34%, podendo chegar até 50% (WEISS, 2002).

De acordo com Sepúlveda (2020) pesquisas são realizadas sobre a eficiência antimicrobiana do óleo essencial de cardamomo, manifestando assim uma atividade antimicrobiana considerável contra os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Segundo Perereira et al. (2014) o óleo essencial de cardamomo tem a capacidade de inibir o crescimento de diversas bactérias, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, sendo considerado um potencial aditivo para conservação de alimentos.

### 3.4. *Staphylococcus aureus*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças transmitidas por alimentos (DTA) são conferidas à ingestão de alimentos ou água contaminados, sendo causadas por agentes físicos, químicos ou biológicos. Estes caracterizam-se pelos parasitas, vírus e, em especial, as bactérias, que são capazes de atuar rigorosamente sob o organismo do indivíduo ou através da produção de toxinas (BRASIL, 2010; SILVA et al., 2010).

A ingestão de alimentos sem alterações sensoriais é apontada como uma das principais causas de surtos, uma vez que estes não são associados com alimentos fonte de DTA, diferente daqueles com aparência ou odor desagradáveis, que normalmente são rejeitados pelos consumidores (MARINHO et al., 2015).

O contato das mãos do manipulador com o alimento é muito importante na sua contaminação (Oliveira et al., 2010). A preparação com antecedência ou em quantidades excessivas, exposição prolongada à temperatura ambiente e descongelamento inadequado, influenciam na proliferação dos agentes. Já o aquecimento, cocção ou reaquecimento insuficiente, contribui para a sobrevivência dos patógenos (SIRTOLI; CAMARELLA, 2018).

Melo et al. (2018) diz que conforme o tipo de manifestação clínica as bactérias causadoras DTA são capazes de ser divididas em grupos. As infecciosas mais importantes são *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli*, as intoxicantes são

*Bacillus cereus*, *S. aureus* e *Clostridium botulinum* e as toxigênicas *E. coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* são exemplos clássicos (BRASIL, 2010).

De acordo com Santana (2006) o diagnóstico de intoxicação alimentar se dá por estafilococos de forma simplificada e confirmado pela identificação de contagens superior a  $10^5$  UFC/g de alimento.

Vittori et al. (2008), argumentaram que *S. aureus* pode se desenvolver em alimentos, de modo que traga riscos aos consumidores, devido a problemas na esterilização de embalagens ou através do processo de recontaminação, sendo este, originado essencialmente pelo manuseio incorreto de alimentos.

O desenvolvimento de DTAs por *S. aureus* pode ocorrer por meio do consumo de uma grande quantidade de alimentos, tais quais: as carnes, principalmente as fatiadas, leite e seus derivados, molhos, enlatados, presunto, salames, produtos de panificação, cremes de ovos, entre outros (FORSYTHE, 2013).

*S. aureus* se caracteriza como coco Gram-positivo formando cacho de uva, e encontrado em peles e mucosas de seres humanos (HARRIS et al., 2002). São bactérias imóveis, não esporuladas e catalase positiva (KONEMAN, 1997). Se desenvolvem em diversos meios de cultura, em com pH 7, com temperatura ótima de crescimento sendo 37 °C (Feitosa et al. 2017). Também são capazes de se desenvolver em meios salinos com um percentual de 15% e a produção de enterotoxina em concentrações de sal de 10% (SANTANA et. al, 2010).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares que apresentam baixo peso molecular. Essas toxinas são produzidas por 30% a 50% das cepas de *S. aureus*, sendo característica a resistência delas ao aquecimento a 100 °C por 30 minutos, o que faz com que processos térmicos como pasteurização e ultrapasteurização sejam inúteis para sua inativação, além disto, ainda resistem aos processos de hidrólise propiciados por enzimas gástricas e intestinais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente seção traz a metodologia utilizada para a realização da pesquisa, cujo enfoque é a realização de um filme biodegradável, antimicrobiano, à base de amido contendo nisina e óleo essencial de cardamomo como conservante natural de alimentos.

### 4.1. Amido de Mandioca

O amido de mandioca foi obtido no comércio local da cidade de Londrina -PR. O óleo de cardamomo (*Elletaria cardamomum*) foi adquirido no comércio especializado. O agente plastificante glicerol foi comprado na empresa Dinâmica. A nisina foi utilizada na concentração de 2,5 mg/mL. O meio Brain Heart Infusin — BHI foi da marca Himedia.

### 4.2. Microrganismo

O isolado de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizado neste experimento. Esta bactéria pertence à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada UTFPR. O isolado estava conservado em glicerol em freezer — 80 °C.

### 4.3. Reativação dos Isolados

Para a reativação microbiológica, uma alíquota de 200 µL foi retirada e inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubada por 24 horas a 37 °C. Após a turvação do meio, foi realizado um inóculo em ágar BHI, e este foi utilizado para a realização dos testes.

### 4.4. Teste Antimicrobiano do Óleo de Cardamomo e Nisina

O óleo de cardamomo e a solução nisina foi testado com *S. aureus*, pela técnica de poço difusão (Borugă et al., 2014). Resumidamente, uma suspensão do microrganismo testado ( $10^6$  células/mL) foi espalhada na superfície do BHI.



Foram feitos poços no ágar e em cada poço foi depositado 30 uL de óleo ou solução nisina em diluições em água (v/v) (1:2, 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 e 1:64). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

#### 4.5. Desenvolvimento do Filme Biodegradável de Amido Contendo Nisina e Óleo de Cardamomo

A produção do filme foi através da técnica de casting. Para tanto, foram desenvolvidos 4 tratamentos diferentes:

a) Protocolo 1:

O amido de mandioca (3%) foi acrescentado em 90 mL de água destilada estéril, e 10 mL de glicerol. A mistura foi mantida sob agitação por  $\pm 95^{\circ}\text{C}$  durante 10 min ou completa dissolução do amido. Em seguida, foram acrescentados 5% de nisina ou 5 mL do óleo de cardamomo, mantendo a agitação por 5 min. A solução filmogênica foi vertida em placas de Petri de acrílico (150 x 20 mm) e mantidas em estufa a 60 °C por 5 a 8 horas ou até a secagem da solução filmogênica. Após secagem a película foi removida e guardada em dessecador.

b) Protocolo 2:

Foi acrescentado 3% de amido de mandioca em 100 mL de água destilada estéril, 2 g de sacarose e 1 mL de glicerol. A mistura foi mantida sob agitação por  $\pm 95^{\circ}\text{C}$  durante 10 min ou completa dissolução do amido e foram acrescentados 5% de nisina ou 5 mL do óleo de cardamomo, mantendo a agitação por 5 min.

A solução filmogênica foi depositada em placas de Petri, nas quais foram colocadas em estufa a 40 °C por 24 h e depois guardadas em dessecador por 3 dias, após secagem a película foi removida.

c) Protocolo 3:

Foi acrescentado 3% de amido de mandioca em 100 mL de água destilada estéril e 1,5 mL de glicerol. O material foi aquecido sob agitação por 40 a 60 minutos até chegar em um aspecto transparente e viscoso. Em seguida foram acrescentados 5% de nisina ou 5 mL do óleo de cardamomo, e depositada em placas de Petri,

mantidos em estufa a 40 °C por 24 h ou até total secagem da solução. Após secagem total a película foi removida.

d) Protocolo 4:

O protocolo 4 segue as condições previamente descritas no protocolo 3, porém alterando para 4% de amido de mandioca e 2 mL de glicerol.

O filme controle foi preparado sem adição de nisina e cardamomo.

#### 4.6. Atividade Microbiana do Filme Biodegradável Contra *S. aureus*

Os filmes contendo cardamomo e nisina, e o filme controle, foram recortados em pedaços de com aproximadamente 1,0 cm; posteriormente, os pedaços foram colocados na superfície do ágar BHI inoculados com *S. aureus* (concentração  $1 \times 10^6$  células/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à formação de halo de inibição ao redor das colônias, seguido da mensuração dos diâmetros do halo de inibição. Os registros foram coletados por fotos.

#### 4.7. Biodegradação do Filme

Para avaliação da biodegradação dos filmes formados, foi simulado condições naturais de degradação em solo (STOLL et al., 2017). Para tanto, foram coletados solos ao redor da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Campus Londrina, e depositados em placas de Petri. O solo foi distribuído em camada de 5 cm e uma porção de filme de cada tratamento (aproximadamente 2 x 2 cm) foram colocados sobre este solo.

O material permaneceu a temperatura ambiente e a avaliação de degradação foi feita visualmente a cada 24 h por 20 dias.

#### 4.8. Teste do Intumescimento

O teste do inchaço seguiu protocolo descrito por Farahnaky et al. (2014). As amostras de filme, com cardamomo, nisina e controle, foram cortadas em quadrados de 2 × 2 cm, e pesados. Em seguida foram imersos em solução aquosa de NaCl 0,1 M por 30 min a 25 °C. Após este período, os quadrados foram removidos, secos em papel de papel de filtro por 5 min para remover o excesso de água da superfície, e pesados novamente.

A taxa de intumescimento (MC) foi calculada usando a Equação 1:

$$SW (\%) = [(M_f - M_i)/M_i] \times 100$$

Onde: Sw (%) é a porcentagem de intumescimento; M<sub>f</sub> é o peso da amostra intumescida e M<sub>i</sub> é o peso da amostra seca.

#### 4.9. Transparência do Filme

Os filmes contendo cardamomo, nisina e controle, foram cortados em pedaços de 2 x 2 cm, e colocados sobre letras impressas em negrito. A imagem foi capturada em câmera de celular.

#### 4.10. Curva de Morte

Os filmes contendo cardamomo, nisina e controle foram cortados em pedaços de 2x2 cm e depositados em tubo de ensaio contendo uma cultura de *S. aureus* (concentração 1 x 10<sup>6</sup> células/mL). Nos tempos 0, 6, 8, 10 e 24 h, foi retirado uma alíquota para contagem de UFC (Unidade Formadora de Colonia). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### INSERIR TEXTO ENTRE DUAS SEÇÕES.

#### 5.1. Teste Antimicrobiano do Óleo de Cardamomo e Nisina

No teste antimicrobiano contendo óleo essencial de cardamomo foi observada a formação de halos de inibição, comprovando sua ação inibitória contra a atividade do microrganismo *S. aureus*. Segundo estudo de Reis et al. (2020) outros óleos essenciais como o de pimenta preta e de manjerição tiveram resultados negativos em relação a capacidade de inibir o desenvolvimento do microrganismo. Na tese de Perereira et al. (2014) foi observada que utilizando óleo essencial de cardamomo obteve-se influência significativa na inibição do patógeno alimentar. Deste modo é possível confirmar que o óleo essencial de cardamomo traz uma aplicabilidade e funcionalidade com maior relevância em contraposição a outros óleos.

É legítimo atestar a partir dos halos de inibição nas placas de teste, a positiva capacidade de inatividade microbiana da bacteriocina, especificamente a nisina, contra o patógeno *S. aureus*. De acordo com o estudo de Silva (2018) no qual foram testadas 30 cepas e 80% delas incluindo a padrão *S. aureus* ATCC255923 foram apresentaram sensibilidade a bacteriocina e formação de halos. Portanto é plausível a aptidão da nisina para inibir o desenvolvimento do microrganismo, representadas na Figura 2.

**Figura 2 – Teste antimicrobiano do óleo de cardamomo e nisina**



Fonte: Autoria própria, 2023.

## 5.2. Desenvolvimento do Filme Biodegradável de Amido Contendo Nisina e Óleo de Cardamomo

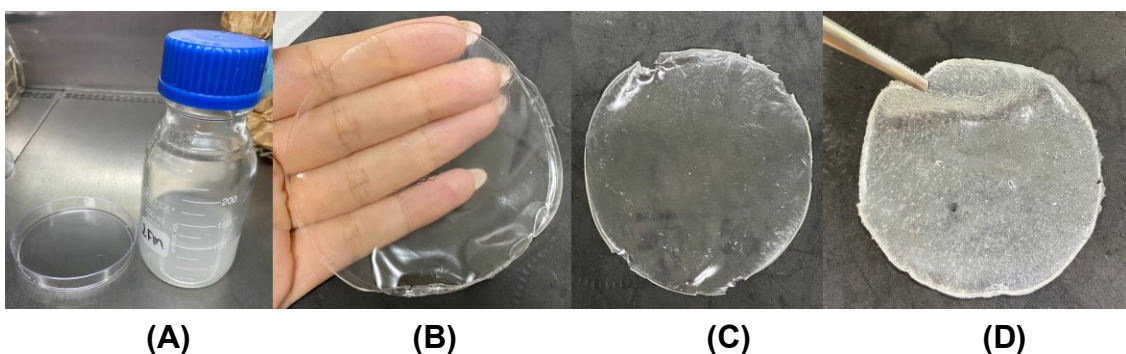
Na produção do filme biodegradável, optou-se pelo tratamento 3, no qual foi utilizado 3% de amido de mandioca em 100 mL de água destilada estéril e 1,5 mL de glicerol como agente plastificante. O material foi aquecido sob agitação por 40 a 60 minutos até apresentar um aspecto transparente e viscoso. Após, foram acrescentados 5% de nisina e 5 mL do óleo de cardamomo, e depositada em placas de Petri, mantidos em estufa a 40 °C por 24 h ou até total secagem da solução. Após secagem total a película foi removida.

Na Figura 2 é apresentado todo o processo de produção no qual é possível visualizar o filme em estado líquido e em seguida após período de secagem. Observa-se que o filme teve sua remoção fácil da placa de petri, apresentando estabilidade ao rompimento.

No estudo desenvolvido por Lapa et al. (2020) o filme é removido facilmente do recipiente em que foram produzidos, apresentando resistência a manipulação devido a capacidade de formação de gel.

Portanto a produção do filme foi relevante, trazendo alta flexibilidade e maleabilidade adequada para aplicação.

**Figura 3 – Produção do filme biodegradável com adição de óleo de cardamomo e nisina. Onde (A) Aspecto da produção do filme; (B) filme controle; (C) filme com nisina; (D) filme com óleo**



Fonte: Autoria própria, 2023.

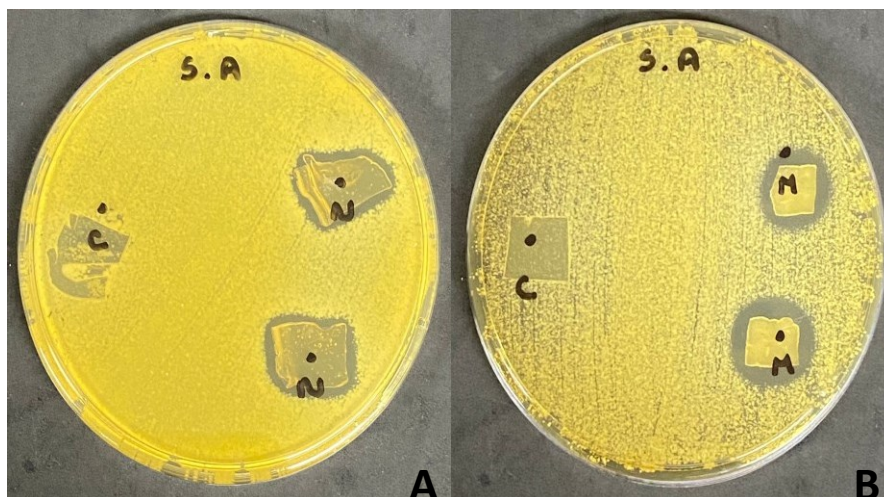
### 5.3. Atividade Microbiana do Filme Biodegradável contra *S. aureus*

Para controle positivo, no qual houve halos de inibição em ambas as placas, com atividade comprovada contra o microrganismo *S. aureus*. Em todas as placas de teste contendo o filme biodegradável com a bacteriocina nisina e óleo essencial de cardamomo, foi atestada a atividade antimicrobiana dos compostos contra *S. aureus*, contendo halos de inibição microbiana, como demonstradas na Figura 4.

No estudo de Perereira et al. (2014) observaram que utilizando óleo essencial de cardamomo obteve-se inibição significativa do patógeno alimentar *S. aureus*. De acordo com Silva (2018), a nisina obteve resultados positivos em sua capacidade de inibir o desenvolvimento do microrganismo.

Portanto é válido comprovar que o crescimento de nisina e óleo essencial de cardamomo ao filme biodegradável de amido de mandioca, geram resultados positivos quanto sua capacidade de impossibilitar o desenvolvimento do patógeno *S.aureus*.

**Figura 4 – Atividade microbiana do filme biodegradável acrescido com nisina e cardamomo em placas de *S. aureus*. Onde na placa A (C) filme controle, (N) filme com nisina e na placa B (C) filme controle e (M) filme com óleo**



Fonte: Autoria própria, 2023.



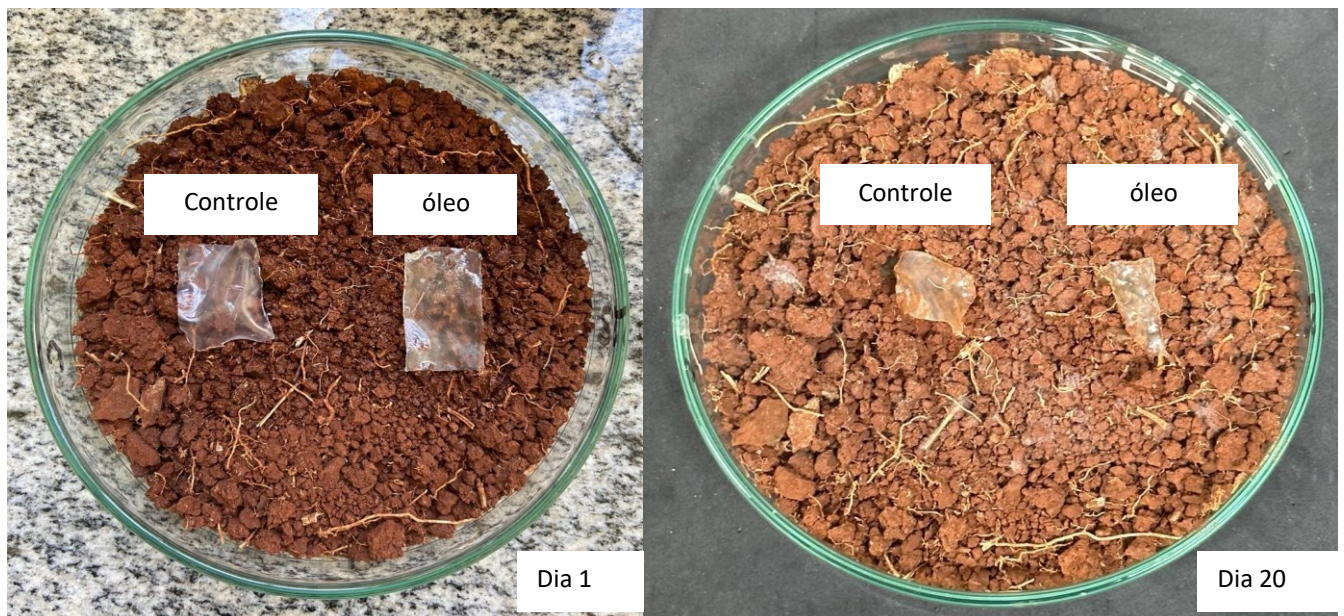
#### 5.4. Biodegradação do Filme

A Figura 5 apresenta as imagens da biodegradabilidade do filme em solo. Esse processo foi observado visualmente e após 20 dias, foi possível concluir que o filme controle foi inteiramente degradado pelo solo e o filme com aditivos ainda havia partes para se degenerar, partes estas que ao toque já estavam quebradiças e quase degradadas por completo.

De acordo com os estudos de Vespucci et al. (2022) no qual foi testada a biodegradabilidade do filme a base de amido de mandioca e obtiveram resultados positivos, em um espaço de tempo de 72 horas, gerando degradação completa do filme.

É legítimo atestar que a biodegradabilidade do filme é positiva, pois o controle degradou-se por completo e o filme com aditivos foi degradado quase por completo em 20 dias, portanto aumentando o tempo de exposição, poderia gerar a degeneração completa do filme.

**Figura 5 – Teste de biodegradabilidade**



Fonte: Autoria própria, 2023.

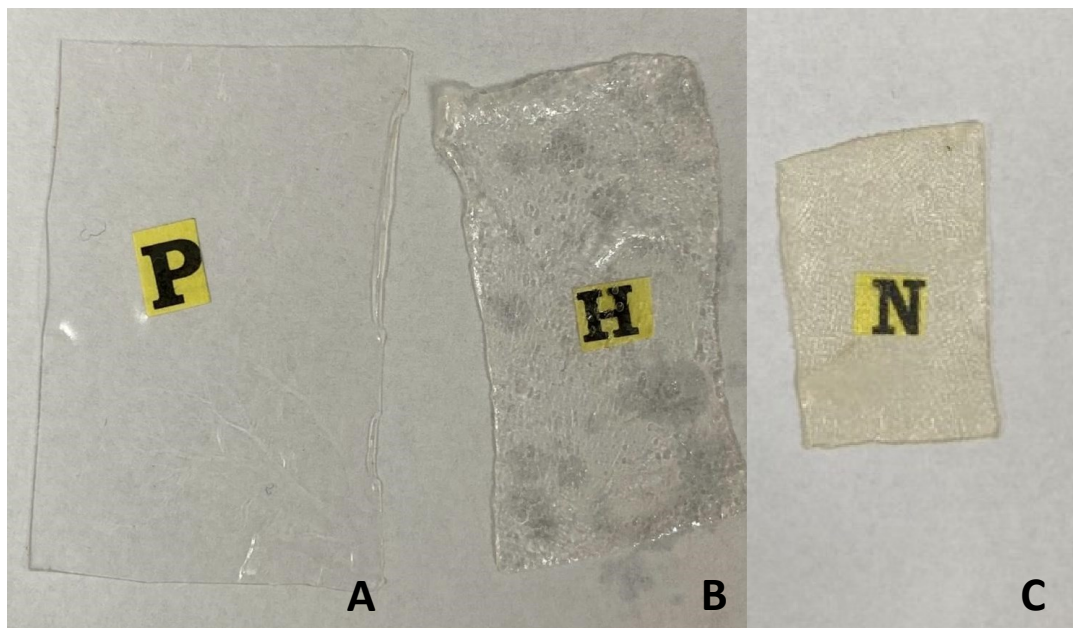
## 5.5. Transparência do Filme

A Figura 6 apresenta as imagens do teste de transparência do filme, o qual foi caracterizado de forma visual. De acordo com Pessanha (2016) os filmes devem apresentar cor uniforme, sem rugosidades excessivas, trazendo consigo um aspecto liso, facilidade de remoção das superfícies onde foram secos, evitando fissuras.

O filme apresentou características bem semelhantes ao desejado segundo o estudo, mas ao ser acrescido com cardamomo obteve-se baixa rugosidade, alteração na cor, porém mesmo com mudança na coloração é perceptível a transparência do filme, pois quando colocado as letras P, H e N embaixo dos filmes, é possível enxergá-las, ainda possuindo resistência a manipulação e sem fissuras.

Portanto, é plausível agregar um resultado positivo a esse teste segundo os estudos de Pessanha (2016), pois grande parte dos critérios para considerar uma transparência adequada do filme foram mantidas.

**Figura 6 – Teste de transparência do filme com nisina e cardamomo**



Fonte: Autoria própria, 2023.



## 5.6. Teste de Intumescimento do Filme Biodegradável

As amostras de filme, com cardamomo, nisina e controle, foram cortadas em quadrados de 2 × 2 cm, e pesados. Em seguida foram imersos em solução aquosa de NaCl 0,1 M por 30 min a 25 °C. Após este período, os quadrados foram removidos, secos em papel de papel de filtro por 5 min para remover o excesso de água da superfície, e pesados novamente.

Foi possível constatar que o filme controle teve maior absorção da solução com Sw de 48,48 % e conforme foram adicionados nisina e cardamomo essa absorção diminuiu, onde Sw nisina foi de 42,00% e cardamomo 41,50% (onde Sw é a porcentagem do intumescimento). Isso pode ser explicado devido a quantidade de amido ainda disponível no filme controle o que possibilita interação com a água, ou glicerol que segundo Fernandes et al. (2015) favorece absorção de água, devido sua higroscopicidade. Enquanto quando adicionado os aditivos podem ter influenciado nessa interação com a água.

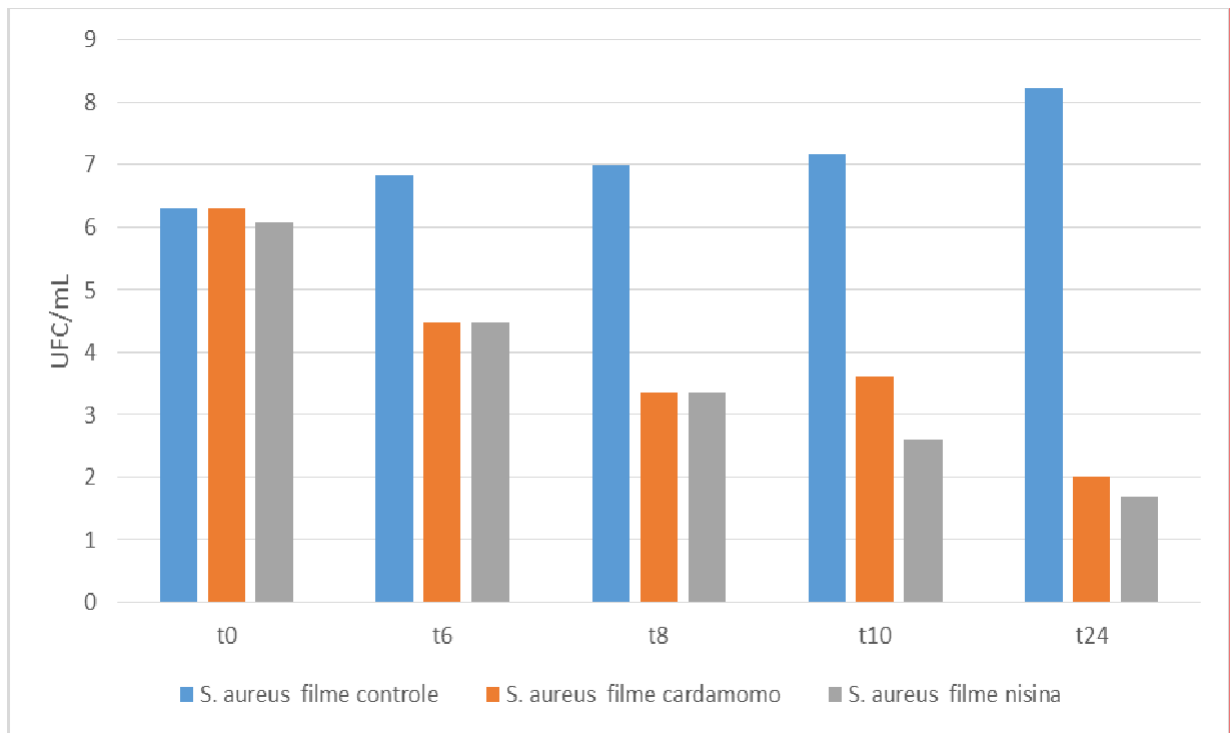
## 5.7. Curva de Morte

A curva de morte do patógeno alimentar *S. aureus* foi realizada a partir do filme biodegradável adicionado de óleo essencial de cardamomo e nisina. A partir da formação de colônias foram realizados os cálculos de UFC.

Partindo do gráfico gerado, é possível constatar que o t6 foi onde começou a inatividade de parte das colônias de *S. aureus* e conforme a análise prosseguiu, t8 e t10 demonstram maiores inibições em relação ao t6. Logo depois no t24 é possível observar que grande parte das colônias bacterianas foram inativadas pelo cardamomo e pela nisina de forma significativa.

Portanto, é plausível concluir que a nisina e o óleo essencial de cardamomo são eficientes na inibição do microrganismo de forma significativa, trazendo então alto potencial de aplicabilidade como conservantes naturais em embalagens ativas.

**Figura 7 – Gráfico de morte *Staphylococcus aureus***



**Fonte: Autoria própria, 2023.**

## 6. CONCLUSÃO

O filme biodegradável à base de fécula de mandioca, acrescido com nisina e óleo essencial de cardamomo, se apresenta como uma alternativa para os polímeros tradicionais, plásticos convencionais utilizados nas indústrias de alimentos a fim de atender os novos consumidores, que procuram alimentos com menos aditivos químicos e conservantes nocivos à saúde. Conforme os resultados apresentados e discutidos, foi possível analisar que o filme acrescido com estes ingredientes é eficiente, inibindo o desenvolvimento do microrganismo *S. aureus*, o mesmo tendo potencial de biodegradabilidade, transparência e intumescimento adequados e possibilitando o uso da bacteriocina e óleo essencial de cardamomo como conservantes naturais de alimentos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA-DÓRIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n° 2, p. 197-203, 2000.

BANGAR, Sneh Punia *et al.* Pearl millet starch-based nanocomposite films reinforced with Kudzu cellulose nanocrystals and essential oil: Effect on functionality and biodegradability. **SciencDirect**. United States of America. v. 157. Jun. 2022.

Borugă, O. *et al.* Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **National Library of Medicine**. v.7. p.56-60. 2014.

BOWER, CK *et al.* Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**, v 25, p81-90, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2010. **Manual integrado de vigilância**, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. 2. ed. Brasília.

BRUNO, M.E.C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.9, p. 3003-3010, 1993.

FARIAS, Mônica Guimarães. Elaboração e caracterização de filmes de amido e polpa de acerola por casting, extrusão termoplástica e termoprensagem. 2016. 188f. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

FEITOSA, Amanda Campos *et al.* Staphylococcus aureus em alimentos. **Revista Desafios**. Tocantins. v4, p1-17. 26 abr. 2017.

FERNANDES, Ana Paula *et al.* Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**. Goiânia, v. 45, n. 2, p. 192-199, abr./jun. 2015

FERREIRA, L. M. *et al.* Filmes biodegradáveis com óleos essenciais de laranja e canela: estudo sobre produção e inibição do crescimento de microrganismos. Ciência e cultura - **Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 93-103, jun. 2009.

FORSYTHE SJ. **Microbiology of Safe Food**. Blackwell Science Ltd Editorial Offices. Oxford. 2010.

FRIEDRICHSEN, Jéssica Souza Alves *et al.* O uso de amido como proposta para embalagens biodegradáveis- Uma revisão. **Research, Society and Development**. Maringá. v.11, n. 1-14. Out. 2022.

GARCIA, Amanda Penazzo. **Desenvolvimento De Filmes Biodegradáveis Ativos A Base De Amido De Milho Adicionados De Extrato De Própolis**. 2016. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.

GOMES, Maria Letícia de Sousa. **Filmes biodegradáveis de mandioca**. 2022. 83F. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2022.

HARRIS, L.G.; FOSTER, S.J.; RICHARDS, R.G. An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relations to adhesion to biomaterials: **Review. National Library of Medicine**. Materials. v.4, n.2, p.39-60. Dez 2002.

LAPA, Leonardo Silva Santos; SILVA, Yago Ribeiro de Oliveira; SALES, Priscila Ferreira. Aplicação das análises espectroscópicas e termogravimétricas em filmes biodegradáveis de amido de milho incorporados com extrato de própolis-verde. **For Science**. Minas Gerais. v. 8, n. 2. jul./dez. 2020.

MARINHO, G. A.; OLIVEIRA, G. S., Lima, J. L.; LOPES, W. M. A.; NUNES, G. A.; NUNES, M. G. A. Perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos e seus fatores causais na região da zona da mata sul de Pernambuco. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**. Pernambuco. n. 17, p. 238-243, 2015.

MARTÍNEZ, Blanca Edelia González; TREVIÑO, Marivel Gómez; SALAS, Zacarias Jiménez. BACTERIOCINAS DE PROBIÓTICOS. **Respyn, Revista Salud Pública y Nutrición**. Nuevo León. v.4, n. 2, p. 1-8, Abril-Junio 2003.

MCMULLEN, Lynn M; STILES, Michael E. Potential for Use of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in the Preservation of Meats. **National Library of Medicine**. Washington, p. 64-71, 1996.

MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Berlin, v.50, p.511-519, 1998.

MORENO, Izildinha *et al.* Characterization of bacteriocins produced by Lactococcus lactis strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. Brazil. p.3-31. set. 2000.

MÜLLER, Priscila Shultz. **Desenvolvimento de embalagem ativa biodegradável de amido de pinhão e de mandioca com antioxidantes e antimicrobianos naturais para conservação de manteiga orgânica**. 2016. 170f. Tese (Doutorado

em Engenharia de Alimentos)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Micahel A. **Microbiologia Médica**. 7º ed. Rio de Janeiro. Elsevier HS-Education. 2014.

OGAKI, Mayara Baptistucci; FURLANETO, Márcia Cristina; FURLANETO-MAIA, Luciana. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 18, n. 4, p. 267-276, out-dez 2015.

Oliveira, Ana Beatriz Almeida de. *et al.* Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais : uma revisão. **Ciência e Saúde**. Rio Grande do Sul. n. 30, p. 279-285, 2010.

PESSANHA, K. L. F. **Elaboração e caracterização físico-química de filmes de amido adicionados de açaí (euterpe oleracea mart.) Liofilizado**. 2016. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) -Instituto de tecnologia Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos, UFRRJ. Seropédica, RJ. 2016.

RAY, S.S.; BOUSMINA, M. IODEGRADABLE Polymers and Their Layered Silicate Nanocomposites: In Greening the 21st Century Materials World. **Scientific Research**. v. 50, n. 8, 2005.

REIS, Juliana Borges et al. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v.3, n.1, p 342-363 Jan- Fev. 2020.

ROSA, Claudia Moreno; FRANCO, Bernadette D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **ConScientiae Saúde**. São Paulo, n. 1, p. 1-8. 2002.

E.H.W. de Santana. *et al.* Estafilococcus em Alimentos. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, jul./set., 2010.

SEPÚLVEDA, Silvia Fernanda Parra. **Estudio de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de Cardamomo (Elettaria cardamomum) y Tomillo (Thymus vulgaris)**. 2020. f.91. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química Ambiental). Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, 2020.

SILVA, Alexandre Martins da. **Filmes Biodegradáveis de Amido Contendo Compostos Ativos Encapsulados e Nanopartículas: Uma Revisão**. 2016. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

SILVA, César Matos Ribeiro da. **Potencial da nisina no controle de Staphylococcus aureus resistente (MRSA) e sensível (MSSA) à meticilina**. 2018, f 63,. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)- Programa de Pós Graduação

em Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

SILVA, Elaine Pereira da; BERGAMINI, Alzira Maria. Morato; OLIVEIRA, Maria Aparecida. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto. **Boletim Epidemiológico Paulista**, SP. n.77 p. 1-6, 2005-2008.

SIRTOLI, Daniela Bezerra; COMARELLA, Larissa. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). **Saúde e Desenvolvimento**, n.12, p.197-209, 2018.

SUEIRO, Ana Claudia *et al.* Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. **Química Nova**, Londrina, v. 39, n. 9, p. 1-6. Jul.2016.

VESPUCCI, Igor Leonardo et al. Filmes Biodegradáveis a base de amido para aplicação em pequenas produções de frutas. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v.8, n. 2, p. 1413-1427, feb. 2022.

VITTORI, Juliano *et al.* Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciênc. rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.761-765, 2008.