

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

MARCELLA VITORIA GALINDO

**FILMES BIODEGRADÁVEIS DE GELATINA E QUITOSANA COM
ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CONSERVAÇÃO DE
PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2017

MARCELLA VITORIA GALINDO

**FILMES BIODEGRADÁVEIS DE GELATINA E QUITOSANA COM
ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CONSERVAÇÃO DE
PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai

Coorientador: Profa. Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka

LONDRINA
2017

TERMO DE APROVAÇÃO

FILMES BIODEGRADÁVEIS DE GELATINA E QUITOSANA COM ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NA CONSERVAÇÃO DE PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO

MARCELLA VITORIA GALINDO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 17 de novembro de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai
Prof.(a) Orientador(a)

Profa. Dra. Lyssa Setsuko Sakanaka
Prof.(a) Coorientador(a)

Prof. Dr. Fabio Augusto Garcia Coró
Membro titular

Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira Andrei
Membro titular

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas bênçãos que tenho recebido para concluir esta etapa e para as próximas que virão.

Deixo registrado também o reconhecimento à minha família e amigos próximos, pois acredito que sem o apoio de todos seria difícil concluir esta etapa.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Marianne Ayumi Shirai, pela calma, sabedoria, paciência e amizade com que me guiou em todos esses anos. Serei eternamente grata.

Aos meus professores (Lyssa, Cláudio, Carlos, Lúcia e Margarida) que se tornaram pessoas muito especiais e que levarei para a vida.

Aos meus colegas de sala, em especial, Alison, Felipe e Thaysa pela amizade e carinho que construímos durante o curso.

Aos meus colegas de laboratório Daniel, Laura, João, Larissa, Ermelindo, Mateus, Isabela, Pedro, George e Pablo, onde compartilhamos grandes momentos de descontração que ficarão guardados em minha memória.

À Secretaria do Curso, pela cooperação.

Enfim, a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Foi o tempo que dedicaste à
tua rosa que a fez tão importante
(O Pequeno Príncipe)

RESUMO

GALINDO, Marcella Vitoria. Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo. 2017. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, 2017.

Devido ao grande impacto que as embalagens produzidas de petróleo e derivados causam ao meio ambiente, faz-se necessário a pesquisa de novos materiais biodegradáveis que possam ser utilizados como embalagens em alimentos para auxiliar na manutenção das características físico-químicas, nutricionais e sensoriais dos mesmos. Neste contexto surgem as embalagens produzidas a partir de polissacarídeos, proteínas e/ou lipídeos, que são obtidos naturalmente em larga escala na natureza. Este trabalho teve por objetivo produzir filmes ativos biodegradáveis de gelatina e quitosana com a incorporação de óleos essenciais de orégano e alecrim e aplicar na conservação de presunto fatiado selado a vácuo armazenado sob refrigeração durante 35 dias. Nos filmes foram determinadas as propriedades mecânicas, a permeabilidade ao vapor de água e a atividade antimicrobiana e antioxidante. Para avaliar se os filmes foram eficazes na conservação do presunto, realizou-se análises microbiológicas de bactérias lácticas e aeróbios mesófilos totais, pH, oxidação lipídica e cor. Com relação à contagem de mesófilos não verificou diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, para a contagem de bactérias lácticas somente o presunto com filme de orégano apresentou baixa contagem (< 10 UFC/g) durante o tempo de 35 dias e isso também pode estar relacionado com o maior pH que apresentou em comparação com os demais tratamentos. Os filmes auxiliaram na manutenção da oxidação lipídica do presunto durante os 15 dias de armazenamento. A coloração vermelha do presunto, verificada pelo parâmetro a^* , apresentou leve redução nas amostras de filme contendo óleo de orégano e alecrim e pode estar relacionada com a oxidação da mioglobina. Com este trabalho, foi possível produzir filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais com atividade antimicrobiana e antioxidante que auxiliaram na manutenção das características físico-químicas e microbiológicas do produto, tornando-se uma alternativa na preservação de presunto fatiado.

Palavras-chave: Polímeros. *Rosmarinus officinales*. *Origanum vulgare*. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

GALINDO, Marcella Vitoria. Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo. 2017. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Londrina, 2017.

Due to the large environmental impact caused by packaging made of petroleum and its derivate, it was found necessary to research new biodegradable materials to be applied as packaging on food aiming the maintenance of its physico-chemical, nutritional and sensitivity characteristics. In this context, it is emerging biodegradable packaging, which may be produced from polysaccharides, proteins and/or lipids, all naturally obtained in large scale in the nature. This work objective was to produce and apply biodegradable films based on gelatin and chitosan incorporated with oregano and rosemary essential oils, as antimicrobial and antioxidant packaging on vacuum-sealed sliced ham refrigerated for 35 days. It was determined mechanical properties, water vapor permeability and both antimicrobial and antioxidant properties of the films. To evaluate films efficacy it was run mesophilic aerobes and lactic bacteria analysis, as well as pH, lipid oxidation and colour analysis. Regarding to mesophilic aerobes counting it was not verified significant difference amongst all treatments. However, for lactic bacteria counting, only the ham with oregano film presented low count (<10 UFC/g) during all 35 days test, which may be related with the low pH showed when compared with the other treatments. The films aided lipid oxidation maintenance during all 15 days of storage. The reddish colour showed by the ham, verified by that a* parameter, presented low reduction for oregano and rosemary films, which may be related with mioglobina oxidation. With this work it was possible to produce biodegradable films based on gelatin and chitosan incorporated with essential oils with antimicrobial and antioxidant properties that helped to maintain microbiological and physico-chemical properties for the product, raising up as an alternative to preserve sliced ham.

Keywords: Polymers. *Rosmarinus officinales*. *Origanum vulgare*. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da cadeia de quitosana	15
Figura 2 – Estrutura química da gelatina	16
Figura 3 – Solução filmogênica controle (A) e com incorporação de óleo essencial de alecrim (B) e orégano (C).....	28
Figura 4 – Filmes de gelatina e quitosana secos: a (FC), b (FA), c (FO).....	29
Figura 5 - Halos de inibição dos filmes de gelatina e quitosana: A (FO) contra <i>E. coli</i> , B (FO), C(FA) e D (FC) contra <i>S. aureus</i>	30
Figura 6 – Atividade antioxidante dos filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais de alecrim e orégano.....	31
Figura 7 – Presunto recoberto com os filmes FC, FO e FA e embalados a vácuo	36
Figura 8 – Valores de pH de presunto embalado à vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades mecânicas de filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais	32
Tabela 2 – PVA, solubilidade e umidade de filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais	34
Tabela 3 – Valores de Oxidação lipídica do presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais.....	38
Tabela 4 – Parâmetros de cor do presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais.....	39
Tabela 5 – Contagem de microrganismos mesófilos e bactérias lácticas em presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais.....	40

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Resistência máxima à tração.....	23
Equação 2 – Elongação na ruptura	23
Equação 3 – Módulo de Young	23
Equação 4 – Taxa de permeabilidade ao vapor de água	24
Equação 5 – Permeabilidade ao vapor de água.....	24
Equação 6 – Solubilidade em água.....	25
Equação 7 – Umidade.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.....	21
Trolox – 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico.....	21
FC – Filme controle	22
FO – Filme com orégano	22
FA – Filme com alecrim.....	22
E – Elongação na ruptura.....	23

MY – Modulo de Young.....	23
T – Resistência máxima a tração	23
TBARS – Ácido 2-tiobarbitúrico	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 FILMES BIODEGRADÁVEIS.....	13
3.2 QUITOSANA	14
3.3 GELATINA.....	16
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	17
3.5 PRESUNTO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 MATERIAL	21
4.2 PRODUÇÃO DOS FILMES	21
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	22
4.3.1 Atividade antioxidante	22
4.3.2 Atividade antimicrobiana	22
4.3.3 Teste de tração	23
4.3.4 Permeabilidade ao vapor de água.....	24
4.3.5 Solubilidade dos filmes.....	24
4.3.6 Umidade dos filmes	25
4.4 APLICAÇÃO DOS FILMES EM PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO	25
4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS.....	26
4.5.1 Contagem de bactérias ácido lácticas e aeróbios mesófilos.....	26
4.5.2 Medida de cor.....	26
4.5.3 Oxidação lipídica do presunto	26
4.5.5 Medida de pH.....	27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

5.1 ASPECTO VISUAL DOS FILMES.....	28
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE	30
5.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	32
5.4 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA, UMIDADE E SOLUBILIDADE	34
5.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO	35
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O grande problema enfrentado pela indústria de alimentos é a forma de manejo durante o transporte e armazenamento, a contaminação microbiana e o amadurecimento precoce de frutas e os resíduos sólidos gerados pelas embalagens de polímeros sintéticos (LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014). Uma das soluções para amenizar estes problemas é a produção de filmes biodegradáveis ativos, que vem ganhando vasta importância, visando a necessidade do cliente que busca o armazenamento de alimentos com qualidade, com elevada vida de prateleira e menor impacto ambiental (SHOGREN; BAGLEY, 1999).

Os filmes biodegradáveis ativos podem ser incorporados com óleos essenciais ou qualquer substância bioativa que interaja diretamente com os alimentos, conferindo-lhe aspectos sensoriais e nutricionais desejáveis (AZEREDO; FARIA; AZEREDO, 2000). Filmes a base de proteínas e polissacarídeos com adição de óleos essenciais têm sido reportados como materiais com baixa permeabilidade ao oxigênio e luz (LIU; KERRY; KERRY, 2006; KANATT; CHANDER; SHARMA, 2008; TONGNUANCHAN et al., 2015).

A gelatina tem sido utilizada na produção de filmes, sendo um biopolímero amplamente utilizada na área farmacêutica e de alimentos, e é obtida a partir da desnaturação do colágeno, que é o principal constituinte de ossos e pele de bovinos, suínos e pescados (GÓMEZ-ESTACA *et al.*, 2010). Entretanto, sua utilização é restrita pelo caráter hidrofílico e conseqüentemente por possuir baixa barreira ao vapor de água (CHIOU *et al.*, 2008).

Uma solução para amenizar as propriedades hidrofílicas da gelatina é a realização de blends com outros polímeros, como a quitosana, que é obtida a partir da desacetilação da quitina, que é um polissacarídeo natural abundante na natureza com vasta aplicação na produção de filmes biodegradáveis. É encontrada em carapaças de crustáceos (caranguejo, lagosta e camarões) e insetos, podendo ser produzida também por fungos (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008) (ELSABEE; ABDOU, 2013). Adicionalmente, possui grande potencial para ser utilizada na produção de embalagens alimentícias e como veículo para liberação controlada de aditivos, uma vez que pesquisas indicam que apresentam boas propriedades

antimicrobianas frente aos microrganismos deteriorantes de alimentos (RAVIKUMAR, 2000) (LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014).

Diversos autores relatam a utilização de óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) em alimentos, pois apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes significativas e são considerados seguros para consumo humano. A utilização de óleos essenciais na produção de filmes ativos a base de gelatina e quitosana é de grande interesse, pois apresentam caráter hidrofóbico e diminuem a afinidade dos filmes com a água. Outro aspecto a considerar é que a adição direta de óleos essenciais em alimentos pode modificar as propriedades sensoriais, pois possuem sabor e aroma pronunciados. Já a incorporação dos óleos nos filmes permite a sua liberação controlada, difundindo gradativamente para o alimento (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; MELO, 2010) (BONILLA; SOBRAL, 2016; PAGNO, 2016).

Neste contexto, este trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na produção de filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais e na caracterização quanto às propriedades mecânicas, propriedades de barreira ao vapor de água, atividade antimicrobiana e antioxidante. Na segunda etapa, os filmes foram aplicados na conservação de presunto embalados a vácuo e análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas durante o armazenamento refrigerado.

2 OBJETIVOS

Desenvolver filmes ativos de quitosana e gelatina incorporados com óleo essencial de alecrim e orégano e aplicá-los na conservação de presunto embalado a vácuo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir filmes biodegradáveis de quitosana com gelatina pela técnica de *casting* com adição de óleo essencial de alecrim e orégano.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos filmes ativos.
- Analisar as propriedades mecânicas, a permeabilidade ao vapor de água, a umidade e a solubilidade dos filmes ativos.
- Aplicar os filmes na conservação de presunto fatiado embalado a vácuo.
- Avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas do presunto durante o armazenamento refrigerado.

3 FILMES BIODEGRADÁVEIS

Filmes e coberturas comestíveis biodegradáveis geralmente são produzidos utilizando-se como matéria-prima polissacarídeos, proteínas e/ou lipídeos. Os filmes são formados sobre suportes e depois aplicados como envoltório de alimentos, enquanto que, as coberturas são formadas diretamente na superfície do alimento (GENNADIOS; WELLER, 1994).

Os filmes biodegradáveis têm a mesma função dos filmes usados como embalagem, protegem os alimentos contra agentes externos e proporcionam barreira contra a permeabilidade de água, gases e luz. Podem ser utilizados como carregadores de substâncias bioativas para a proteção dos alimentos que serão acondicionados, conferindo manutenção de textura e segurança durante o seu armazenamento (SHOGREN; BAGLEY, 1999).

A utilização dos biopolímeros dependerá da sua disponibilidade, custo, propriedades de barreira, propriedades mecânicas, funcionais e sensoriais, e das condições em que os filmes serão armazenados, interferindo diretamente na sua integridade por conta da sua estrutura química (CUQ et al., 1995).

Para a produção dos filmes biodegradáveis é necessário que os biopolímeros constituintes da matriz apresentem boas interações entre si e sejam contínuos (GONTARD; GUILBERT, 1996). Além dos biopolímeros, para a confecção dos filmes faz-se uso de plastificantes que os tornarão mais flexíveis (SHIH, 1996). Vários autores estudaram proteínas miofibrilares e polissacarídeos indicando que são bons componentes de matriz, uma vez que filmes de proteínas apresentam melhores propriedades mecânicas do que os de polissacarídeos, porém, os filmes de polissacarídeos são melhores barreiras contra gases e a mistura dos dois biopolímeros tornam os filmes com outras características (CUQ et al., 1995).

Filmes à base de proteínas (gelatina e colágeno, zeína, glúten) e/ou polissacarídeos (celulose, quitosana, gomas) possuem caráter hidrofílico e estão suscetíveis a variação de suas propriedades funcionais quando expostos a ambientes com alta umidade relativa (SHIH, 1996), devendo-se fazer uso de substâncias que confirmam caráter hidrofóbico aos filmes, como por exemplo os lipídeos que auxiliam na diminuição da permeabilidade ao vapor de água, porém estas substâncias lipídicas conferem certa opacidade aos filmes, além de torna-los

mais rígidos como os lipídeos, diminuindo a permeabilidade ao vapor de água, entretanto torna os filmes opacos e mais quebradiços (GALLO et al., 2000).

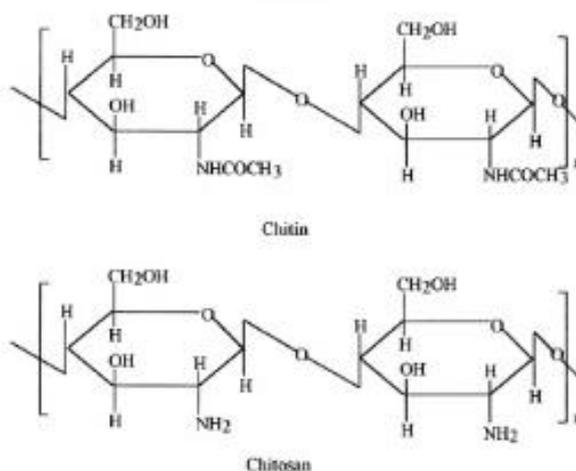
A importância da determinação das propriedades mecânicas dos filmes está relacionada com a capacidade em que eles têm de se comportar frente aos ambientes de estocagens alimentícias, transporte e acondicionamento. Filmes com propriedades mecânicas deficientes causam problemas associados à segurança dos alimentos e conseqüentemente aos consumidores, e perdas econômicas para os fabricantes. As propriedades de tração constituem a resistência à deformação das embalagens no alongamento quando se é aplicado a tração. O teste de perfuração apresenta a capacidade que o filme tem de se comportar frente a produtos acondicionados que sejam pontiagudos e possam danificar o material (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Os alimentos em geral são suscetíveis à deterioração pelo ganho ou perda de umidade para o ambiente, perdendo a crocância ou a maciez, como por exemplo, biscoitos e pães, respectivamente. Para tais produtos as embalagens devem atuar como barreira ao vapor de água e assegurar certa estabilidade para o acondicionamento seguro e de qualidade ao alimento. Portanto a composição dos filmes influencia diretamente a qualidade do alimento acondicionado (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

3.2 QUITOSANA

A quitosana é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. É obtida a partir da desacetilação da quitina, composta por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β (1-4). O grupo amino (NH_2) presente em sua estrutura, quando em meio ácido, apresenta cargas positivas devido à sua protonação (NH_3^+). Geralmente é encontrada em exoesqueletos de crustáceos e insetos, podendo ser produzida também por fungos (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* e *Penicillium notatum*) (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; ELSABEE; ABDOU, 2013). Na Figura 1 é possível observar a estrutura da cadeia de quitina e quitosana.

Figura 1: Estrutura química da cadeia de quitosana



Fonte: RAVI-KUMAR, 2000.

A quitosana tem sido reportada como um polímero não-tóxico, biodegradável, biocompatível, com propriedades funcionais, potencial antimicrobiano e antioxidante, sendo muito utilizada na indústria de alimentos, na área biomédica, farmacêutica, e para liberação controlada de fármacos e substâncias bioativas. Em função da sua estrutura química, a quitosana se torna uma excelente alternativa para ser utilizada como base na produção de nanopartículas, micropartículas, hidrogéis, partículas, embalagens e filmes biodegradáveis (RAVI-KUMAR, 2000; YUAN; CHEN; LI, 2016).

As embalagens de alimentos possuem como matriz polímeros provenientes de petróleo, e a quitosana, por ser biodegradável, se torna uma alternativa para a diminuição dos impactos ambientais gerados pelos resíduos sólidos, e possui atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patógenos e deteriorantes, uma vez que, devido às suas cargas positivas, ela interage nas cargas aniônicas da membrana celular dos microrganismos impedindo que os mesmos se desenvolvam, aumentando a vida útil dos alimentos, mantendo suas características sensoriais com qualidade e segurança, e conseqüentemente diminui os desperdícios (DUTTA et al., 2009).

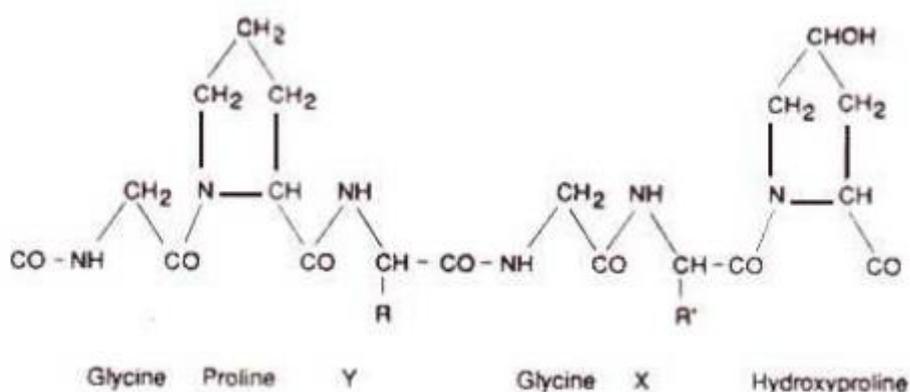
Alguns estudos utilizaram matrizes de quitosana e gelatina para produção de filmes e obtiveram bons resultados de barreira ao oxigênio, água e luz. A junção dos dois biopolímeros está sendo muito utilizada para produção de embalagens alimentícias por serem biodegradáveis e amplamente encontrados na natureza (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; HOSSEINI et al., 2013; JRIDI et al., 2014; HOSSEINI et al., 2015)

3.3 GELATINA

A gelatina é uma proteína linear resultante da desnaturação do colágeno de origem bovina, suína e de pescados, por hidrólise em meio ácido ou meio alcalino, por meio da quebra das cadeias de tripla-hélices. Existem dois tipos de gelatina: tipo A e tipo B, que são diferentes no tipo de preparação específica. Tipo A é previamente tratada com ácido antes da desnaturação com pl de 7-9, e tipo B é tratada com substâncias alcalinas, obtendo-se um pl em torno de 4,6 - 5,2 (STAINSBY, 1987 apud KARIM e BHART, 2009).

A gelatina encontra-se cristalizada com coloração amarelo-palha (BIGI et al, 1998), é solúvel em água quente e insolúvel em água fria. É uma proteína de digestão fácil e possui vários aminoácidos, menos o triptofano, além de fazer parte da composição de tecidos conectivos de animais. É constituída de prolina, hidroxiprolina e glicina, não-tóxica, biodegradável e de baixo custo. De acordo com a Figura 2, é possível observar a estrutura química da cadeia de gelatina. As moléculas de gelatina são constituídas de sequências triplas de glicina-X-Y, sendo X a prolina e Y, hidroxiprolina, que são responsáveis pela formação de géis, retendo água nas regiões de tripla hélices que serão formadas (POPPE, 1987 apud BERTAN, 2003).

Figura 2: Estrutura química da gelatina



Fonte: POPPE, 1987 apud BERTAN, 2003

A gelatina é uma proteína muito utilizada para formação de filmes comestíveis de vegetais e como agente encapsulante de substâncias bioativas e alguns autores utilizaram gelatina afirmando ser uma boa matriz contra gases (O₂ e CO₂) (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

Tongnuanchan et al., (2015), produziu filmes a base de gelatina com a incorporação de óleo de palma livre e obteve resultados satisfatórios em relação a propriedade de barreira à água, onde com o incremento da substância hidrofóbica, diminuiu significativamente a passagem de água pelo filme.

Gómez-Estaca et al. (2009) estudou as propriedades de filmes de gelatina com a adição de extrato aquoso de orégano e alecrim e observou que a adição dos extratos não alterou as propriedades de permeabilidade ao vapor de água, tornando-se semelhante ao filme controle que não possuía extrato vegetal.

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são substâncias naturais que desempenham função de proteção em plantas e utilizados como condimentos e flavorizantes em alimentos, sendo reconhecidos como GRAS (*Generally recognized as Safe*) para o consumo humano. São conhecidos também como óleos voláteis de estrutura complexa de substâncias lipofílicas e odoríferas (CRAVEIRO; MACHADO, 1986; BURT, 2004).

São extraídos de diversas plantas em diferentes lugares (flor, semente, raiz) por diversas técnicas por exemplo, extração por solventes, destilação à vapor, sendo este último o mais utilizado em escala de produção comercial, por apresentar 93% de extração, e mais barata quando comparada com métodos mais avançados como extração com fluídos supercríticos (MASANGO, 2005) e ser uma técnica relativamente simples que não utiliza solventes tóxicos, por exemplo éter e hexano. A destilação por arraste de vapor de água fundamenta-se pelo arraste de água em um sistema fechado, onde este vapor quando em contato com a amostra, ocasiona a quebra da estrutura celular da planta liberando os compostos aromáticos (óleos essenciais) (PERINEAU; GANOU; VILAREM, 1992).

Alguns óleos essenciais possuem naturalmente atividade antioxidante e/ou antimicrobiana, que dependem das propriedades químicas da planta, fonte em que o óleo foi extraído e método ou solvente utilizado na extração. Os principais componentes responsáveis por estas características são terpenos, terpenos oxigenados, aldeídos, cetonas, álcoois e fenóis (BAKKALI et al., 2008). Entretanto, os óleos essenciais são constituídos de diferentes componentes fazendo com que

não seja apenas uma substância, mas sim a junção de vários compostos para a eficácia da atividade contra microrganismos (BURT, 2004).

Dentre os componentes químicos encontrados nos óleos essenciais, o carvacrol sobressai como um grande componente relacionado a ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, interagindo com componentes da membrana celular do microrganismo, desequilibrando a permeabilidade de íons essenciais para o seu desenvolvimento (BURT, 2004; VELDHUIZEN et al., 2006). Para a ação antioxidante são descritos como componentes majoritários: timol (BOZIN et al., 2006) e eugenol (WEI; SHIBAMOTO, 2010). Óleos essenciais podem ser utilizados como antioxidantes naturais, prevenindo a oxidação lipídica nos alimentos (DAPKEVICIUS et al., 1998). Utilizado também como componente ativo para aplicação em embalagens de alimentos, aumentando significativamente a barreira de vapor de água, devido a sua característica hidrofóbica. A utilização de óleos essenciais em alimentos deve ser cautelosa, pelo fato de que o excesso de compostos aromáticos no alimento acarretará em características sensoriais indesejáveis (COMA, 2008).

Vários estudos utilizam óleos essenciais para aplicação em embalagens alimentícias (BITENCOURT, 2013; ROMANI; PRENTICE-HERNANDEZ; MARTINS, 2016; PAGNO, 2016; MARANGON et al., 2017). Dentre os óleos essenciais utilizados em filmes, o óleo de orégano e de alecrim apresentam grande aplicabilidade como alternativa para substituir aditivos antimicrobianos sintéticos (YUAN; CHEN; LI, 2016).

O alecrim do gênero *Rosmarinus officinales* Laminaceous, é uma planta que cresce na forma de arbustos selvagem nos países entorno do mar mediterrâneo amplamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, pois apresenta em sua composição química, substâncias com princípios ativos antioxidante e antimicrobiano, que se devem principalmente aos compostos fenólicos (FLAMINI et al., 2002).

Alguns autores utilizaram o óleo essencial de alecrim em embalagens e obtiveram resultados positivos contra o crescimento de microrganismos no alimento (MELO, 2010; YUAN; CHEN; LI, 2016) devido aos seus constituintes (α -pineno, acetato de bornil, cânfora, 1-8-cineol, limoneno, borneol e verbenona), que compõe 80% do total de componentes do óleo (BURT, 2004; OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010; KADRI et al., 2011), descreve o óleo de alecrim com capacidade

contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em estudos relacionados, Silveira et al. (2012), obteve altos valores de inibição contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* utilizando óleo essencial de alecrim puro através da técnica de difusão em disco.

O óleo de orégano (*Origanum vulgare*) é muito utilizado para a produção de filmes biodegradáveis para a conservação de alimentos, devido aos seus componentes (carvacrol e timol) (BOUNATIROU et al., 2007). De acordo com alguns estudos os óleos essenciais foram antimicrobianos e antioxidantes (SEYDIM; SARIKUS, 2006; ROMANI; PRENTICE-HERNANDEZ; MARTINS, 2016) demonstrando que seu uso é de grande interesse na incorporação de filmes ativos biodegradáveis, visando uma melhoria na qualidade sensorial, funcional e de segurança para os consumidores (ARFA et al., 2007).

3.5 PRESUNTO

De acordo com a Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por presunto, o “produto cárneo industrializado obtido exclusivamente com o pernil de suínos, desossado, adicionado de ingredientes, e submetido a um processo de cozimento adequado”, com quantidade de proteína mínima de 14%, máximo de 2,0% de gordura (BRASIL, 2000), pH acima de 6, com teor de sal entre 2% a 4% e nitrito residual abaixo de 100 ppm, tornando-se um produto altamente perecível, (HOLLEY, 1997) e suscetível a diversos fatores, como contaminação microbiológica e alterações físicas e químicas (OLIVO, 2006).

A cor do produto cárneo é dependente da miglobina que varia com a espécie do animal, estando ela oxidada (oximioglobina, metamioglobina) ou reduzida (deoximioglobina), e são parâmetros essenciais para a atratividade da carne pelo consumidor (CORNFORTH, 1994).

A oxidação lipídica divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação. A iniciação esta relacionada com a presença de metais de transição, como o ferro, presente em produtos cárneos, atuando como catalisadores, capazes de interagir com o oxigênio que reage com a molécula de ácido graxo insaturado, retirando o átomo de hidrogênio do carbono que se encontra ao lado da ligação

dupla *cis* (KANNER, 1994). Na reação de propagação, ocorre a formação de peróxidos que podem ser quantificados nas análises de oxidação lipídica em alimentos (GRAY, 1978), e na fase de terminação, ocorre a polimerização dos peróxidos, com a formação de produtos finais da oxidação, como aldeídos, hidrocarbonetos, álcoois e ácidos que estão associados no desenvolvimento de odores e sabores negativos, afetando diretamente na qualidade dos produtos cárneos (KUBOW, 1992).

O presunto fatiado por ser bastante manipulado, apresenta facilidade em oxidar-se pelo fato de estar amplamente exposto ao oxigênio, tornando-se também propício para o desenvolvimento de microrganismos aeróbios. Como alternativa para minimizar as perdas sensoriais e nutricionais que o presunto pode vir a sofrer, o acondicionamento a vácuo é de suma importância, visando o aumento da vida útil e segurança alimentar (BRESSAN et al., 2007). A contagem de microrganismos mesófilos para produtos cárneos processados deve consistir entre 10^2 e 10^3 UFC/g, que abrange ampla variedade de espécies, como por exemplo, bactérias ácido lácticas (BORCH; KANT-MUERMANS; BIXT, 1996).

Com a ausência do oxigênio, as bactérias ácido-láticas se desenvolvem e apresentam um grande número de microrganismos deteriorantes de carnes cozidas ou produtos cárneos a vácuo. Alguns autores afirmam que estas bactérias são parte da microbiota natural da carne utilizada para o processamento e que são refrigerados que tornam o produto com odores indesejáveis e formação de limo na superfície (KORKEALA; MAKELA, 1989).

Para a verificação da vida útil de produtos cárneos, é necessária a realização de análises no dia do processamento e no mínimo três vezes durante o seu acondicionamento. As análises mais importantes são: oxidação lipídica, pH e acidez, parâmetros microbiológicos, cor e características sensoriais (sabor, textura, odor) (EBURNE; PRETICE, 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de uma pesquisa acadêmica, de carácter experimental. Todo o experimento foi realizado nos laboratórios do curso de Tecnologia de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Londrina.

4.1 MATERIAL

Para a produção dos filmes, utilizou-se quitosana de baixa massa molar (Sigma Aldrich, EUA) com grau de desacetilação de 85%, gelatina tipo B com bloom 250 (Gelita do Brasil, Brasil), glicerol (Dinâmica, Brasil), óleo de alecrim (Ferquima, Brasil), óleo de orégano (Quinarí, Brasil) e tween 80 (Anidrol, Brasil)

Para a realização das análises antimicrobianas, utilizou-se os seguintes materiais: Ágar Mueller Hinton (Himedia, Índia), caldo Mueller Hinton (Himedia, Índia), Ágar MRS (Himedia, Índia), Ágar Para Contagem (Himedia, Índia), Peptona Bacteriológica (Himedia, Índia).

Para a análise antioxidante utilizou-se 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox), ambos da Sigma Aldrich, EUA.

4.2 PRODUÇÃO DOS FILMES

Os filmes foram preparados pela técnica de *casting*, a partir da metodologia empregada por Bonilla e Sobral (2016) com algumas modificações. Inicialmente preparou-se as soluções de gelatina e quitosana separadamente. A quitosana (Q) 2% (m/v) foi dissolvida em ácido acético 1% (v/v) e mantida sob agitação magnética com aquecimento a 45° C por 1 hora. A solução de gelatina (GEL) 4% (p/v) com adição de glicerol (1 g/100 mL de solução de gelatina) foi dissolvida sob agitação magnética e aquecimento à 55° C por 35 min.. Posteriormente foi feita a mistura das duas soluções, na proporção de 1:1, com incorporação de 2% de óleo essencial (p/v) e 1% de Tween 80 (p/v). A concentração de óleo essencial a ser adicionada nos filmes foi definida por testes preliminares, considerando a presença de atividade

antimicrobiana dos mesmos. Finalmente as soluções foram homogeneizadas em ultra-turrax (marca IKA, modelo T18) a 10.000 rpm por 4 min., vertidos em placas de acrílico e secos em estufa BOD (Tecnal, Brasil) *over night* a 25 ° C. Os filmes produzidos consistiram em: controle (F.C), sem adição de óleo, filme com óleo essencial de orégano (F.O) e filme com óleo essencial de alecrim (F.A).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.3.1 Atividade antioxidante

A análise antioxidante dos filmes foi realizada pelo método de DPPH de acordo com Rufino et al. (2007), que se baseou na capacidade de um antioxidante reduzir o DPPH através da transferência de elétrons, fazendo com que descore a solução. Os filmes (1 g) foram misturados com 20 mL de etanol absoluto e homogeneizados a 6.000 rpm por 15 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada, 30 µL do sobrenadante foi misturada com 3 mL de solução DPPH a 0,06 µM e manteve-se em ambiente escuro por 45 minutos. Após o tempo de incubação, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV-Vis (Femto, Brasil) com comprimento de onda de 518 nm. Os resultados foram quantificados através de uma curva de calibração com o padrão trolox com concentrações que variaram de 100 à 1500 µmol/L ($y = -0,0003x + 0,5632$, $R^2 = 0,9994$), e foram expressos em µmol equivalente de trolox por 100 g de filme.

4.3.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos filmes foi realizada pela técnica de difusão de disco de acordo com a metodologia desenvolvida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003), onde os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 35218). Inicialmente as bactérias foram reativadas em tubos contendo caldo Müller Hinton e incubadas a 35°C por 24 horas. Após este processo, retirou-se 0,1 mL do caldo e transferiu-se para um tubo contendo água peptonada 0,1% (p/v) e foi comparada a turbidez do

tubo com o padrão 0,5 da escala McFarland, que corresponde a 10^8 UFC/mL. Placas de Petri contendo Ágar Müeller Hinton foram adicionadas de 0,1 mL de suspensão bacteriana e foi feita a semeadura com alça de drigalsky. Em seguida, os filmes com diâmetro de 1,5 cm foram dispostos no meio das placas. Finalmente, as placas foram incubadas a 35°C por 24-48 horas e observou-se a formação de halo de inibição.

4.3.3 Teste de tração

Os testes de tração foram feitos em texturômetro da marca Stable Micro Systems, modelo TA XTplus (Inglaterra), conforme a norma D-882-00 da American Society for Testing and Material (ASTM, 2001). Para cada formulação foram cortados 10 corpos de prova nas dimensões de 1 x 8 cm, medido a espessura e condicionados em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio (Umidade Relativa (UR) de 53%) a 25°C, pelo período de 48 horas. As condições do ensaio foram: distância inicial entre as garras de 30 mm e velocidade de tração de 0,8 mm/s.

A resistência máxima à tração ($R_{máx}$) se dá pela relação entre a força máxima ($F_{máx}$) medida e a área (A) inicial do corpo de prova, a qual é calculada com os valores de largura (L) e espessura (e) do corpo de prova, utilizando a Equação 1.

$$R_{máx} = \frac{F_{máx}}{A_{mín}} = \frac{F_{máx}}{L \cdot e_{mín}} \quad (1)$$

A elongação na ruptura (E) foi medida através da relação do percentual entre a elongação (E_{rup}) do corpo de prova na ruptura e o seu comprimento inicial, que correspondeu à distância entre as garras (D_{garras}) como mostrado na Equação 2.

$$E = \frac{E_{rup}}{D_{garras}} \cdot 100 \quad (2)$$

O módulo de Young (MY) foi determinado a partir da região linear da curva de tensão versus deformação, conhecida como região elástica, de acordo com a Equação 3.

$$MY = \frac{F_x}{(e \cdot L)} \cdot \frac{DG}{A_x} \quad (3)$$

MY = Módulo de Young (MPa)

F_x = Força registrada no ponto x, da região linear (N)

e = Espessura do corpo de prova (m)

L = Largura inicial do corpo de prova (m)

DG = Distância entre as garras (m)

A_x = Alongamento registrado no ponto x (m)

4.3.4 Permeabilidade ao vapor de água

Neste trabalho, o método aplicado para medir a permeabilidade ao vapor de água foi por gravimetria de acordo com a ASTM E96-00 (2000), onde a amostra foi colocada em uma cápsula de alumínio contendo sílica, condicionada em um dessecador com umidade relativa de 75%, e foram realizadas dez pesagens com intervalos de tempo para verificar o ganho de massa. Calculou-se a taxa de permeabilidade do material de acordo com a Equação 4, e a permeabilidade ao vapor de água, com a Equação 5

$$TPVA = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A} \quad (4)$$

$$PVA = \frac{(TPVA \times e)}{p_s \times (UR1 - UR2)} \quad (5)$$

PVA= Permeabilidade ao vapor e água ($\text{g.h}^{-1}.\text{m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)

e = Espessura média do corpo de prova (m)

P_s = Pressão de saturação de vapor a temperatura do ensaio (Pa)

UR1= Umidade relativa dentro do dessecador (%)

UR2= Umidade relativa dentro da cápsula (%)

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

m = Ganho de massa de água (g)

t = tempo (h)

A = Área de permeação do corpo de prova (m^2)

4.3.5 Solubilidade dos filmes

Para a realização da análise de solubilidade em água, foi utilizada a metodologia empregada por Gontard, Guilbert e Cuq (1992) com algumas modificações. Filmes de 4cm^2 foram adicionados em erlenmeyers contendo 200 mL

de água destilada e seguiram para agitação em incubadora shaker (Novatecnica, Brasil) a 140 rpm por 24 horas, a 25° C . Em seguida os filmes foram secos em estufa a 105 °C por 24 horas para determinar a massa seca final. A solubilidade em água dos filmes foi calculada com a Equação 6.

$$SOL = \frac{(m_{i2} - m_{s2})}{m_{i2} - m_a} \times 100 \quad (6)$$

m_{s2} = massa seca final (g)

m_{i2} = massa seca inicial (g)

m_a = massa de água

SOL= Solubilidade do filme (%)

4.3.6 Umidade dos filmes

A umidade dos filmes foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 24 horas de acordo com a Association of Official Analytical Chemists 930.04 (AOAC, 1990). A umidade foi calculada com a Equação 7, onde U é a umidade do filme (%), m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_s é a massa seca final da amostra (g).

$$U = \frac{(m_{i1} - m_{s1})}{m_{i1}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

M_{i1} = massa inicial (g)

M_{s1} = massa seca final da amostra (g)

U= umidade (%)

4.4 APLICAÇÃO DOS FILMES EM PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO

Os filmes foram aplicados em fatias unitárias de presunto adquirida no comércio da cidade de Londrina - PR. O presunto foi cortado no tamanho de 8 cm x 14,5 cm e 1 cm de espessura. Cada face do presunto foi recoberto com uma formulação de filme (FC, FO ou FA), acondicionados em sacos plásticos e selados a vácuo com uma seladora (Selovac, Brasil). O presunto sem recobrimento com filme

também foi embalado a vácuo como controle. Finalmente as amostras foram armazenadas em estufa incubadora (BOD) a 8°C pelo período de 35 dias.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

As análises microbiológicas, pH, oxidação lipídica e cor do presunto recoberto ou não com os filmes (Controle, FC, FA e FO) e embalados a vácuo foram realizadas nos tempos 0, 15 e 35 dias.

4.5.1 Contagem de bactérias ácido lácticas e aeróbios mesófilos

As contagens de bactérias aeróbios mesófilos e bactérias ácido lácticas foram realizadas de acordo com SILVA et al., (2007). Inicialmente, de cada formulação (C, FC, FA E FO), foram pesados 25 g de presunto e adicionou-se em 225 mL de água peptonada 0,1%. Diluições seriadas foram realizadas até 10^{-3} . A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi realizada em ágar PCA (plate count agar) com incubação a 35°C por 48 horas, utilizando-se a técnica *pour plate* (por profundidade). Para a contagem total de bactérias ácido lácticas utilizou-se o Ágar MRS, inoculação em sobrecamada e incubação a 35°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por g de presunto (UFC/g).

4.5.2 Medida de cor

A medida da cor do presunto foi feita com um colorímetro da marca KONICA MINOLTA, modelo CR-400, onde inseriu-se a amostra diretamente no sensor do equipamento. Os parâmetros recolhidos dos filmes consistiram em L*(luminosidade), a*(vermelho-verde) e b*(amarelo-azul).

4.5.3 Oxidação lipídica do presunto

Para a realização da oxidação lipídica, empregou-se a metodologia descrita por Bruna et al. (2001) de quantificação de substâncias capazes de reagir com o

ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Foi feita a extração dos aldeídos utilizando um homogeneizador ultra turrax, a 10.000 rpm por 3 minutos, de uma solução contendo 5 g de presunto e 25 mL de uma solução de ácido tricloroacético 7,5% (p/v) e 0,1 % de BHT. Em seguida a solução foi filtrada em papel filtro e uma alíquota de 5 mL do filtrado foi colocada em tubo de ensaio, logo após, foi adicionado 5 mL de solução de ácido 2- tiobarbitúrico a 0,02 mol/L, e aquecido em banho-maria (100°C) por 40 min. para a formação do complexo colorido. Posteriormente, esta solução seguiu para a medida da absorbância em espectrofotômetro UV/visível com comprimento de onda de 538 nm. Para a quantificação do complexo colorido, foi elaborado uma curva padrão de 1,1,2,2 tetrametoxipropano, nas concentrações de 1,5 a 6,0 x10⁻⁸ ($y=1 \times 10^7 x + 0,055$, $R^2= 0,9943$). O resultado da oxidação lipídica foi expresso em mg de malonaldeído/kg de amostra de presunto.

4.5.5 Medida de pH

As medidas de pH foram realizadas em triplicata, através de um pHmetro (Hanna Instruments, EUA) com eletrodo de vidro combinado, onde utilizou-se 3 g de presunto em 30 mL de água deionizada.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

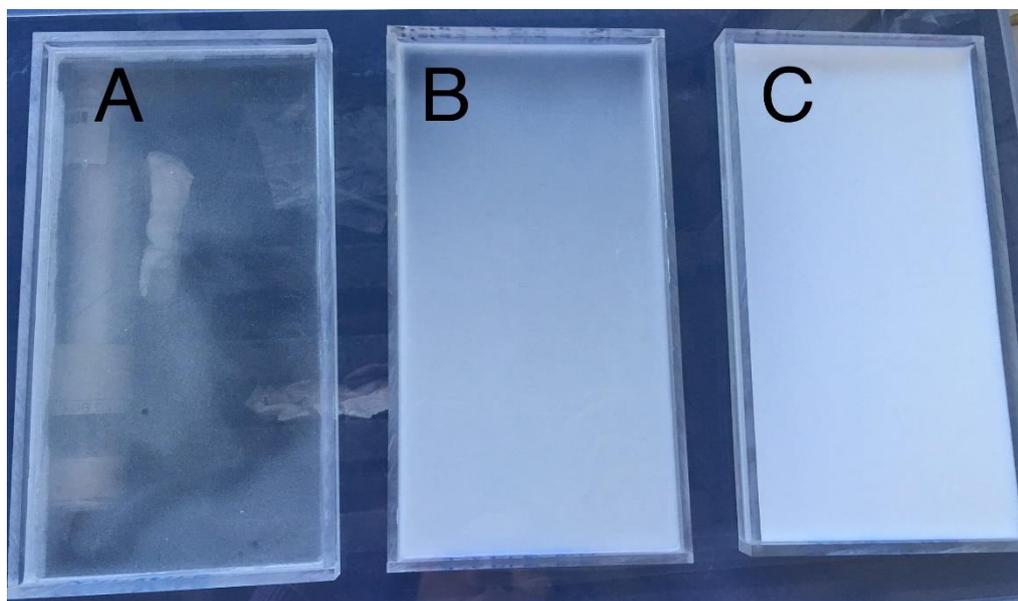
Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software Statistica 7.0 (StatSoft, EUA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ASPECTO VISUAL DOS FILMES

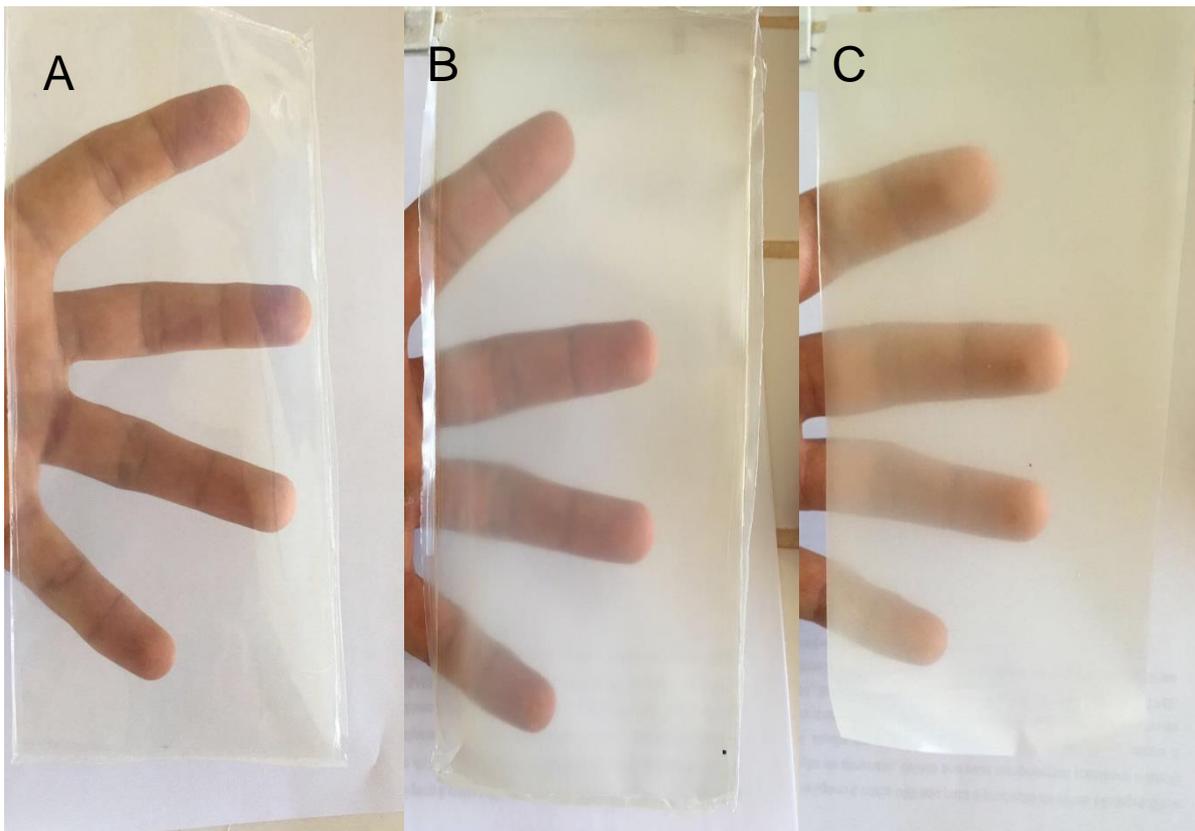
Os filmes de gelatina e quitosana foram produzidos com êxito pela técnica de *casting*, de acordo com a metodologia empregada por Bonilla e Sobral (2016). A partir das Figuras 3 e 4, é possível visualizar a solução filmogênica e a aparência dos filmes após a secagem. Os filmes foram de fácil manipulação e saíram com facilidade das placas de acrílico depois de secos. O controle apresentou maior transparência e brilho, em contrapartida, os filmes adicionados de óleo essencial se mostraram mais opacos, corroborando com as características descritas por Gallo et al. (2000). Todas as formulações apresentaram a superfície lisa, homogênea e sem migração aparente de glicerol ou óleo essencial.

Figura 3 – Solução filmogênica controle (A) e com incorporação de óleo essencial de alecrim (B) e orégano (C).



Fonte: Autoria Própria, 2017

Figura 4 – Filmes de gelatina e quitosana secos: A (FC); B (FA); C (FO)



Fonte: Autoria Própria, 2017.

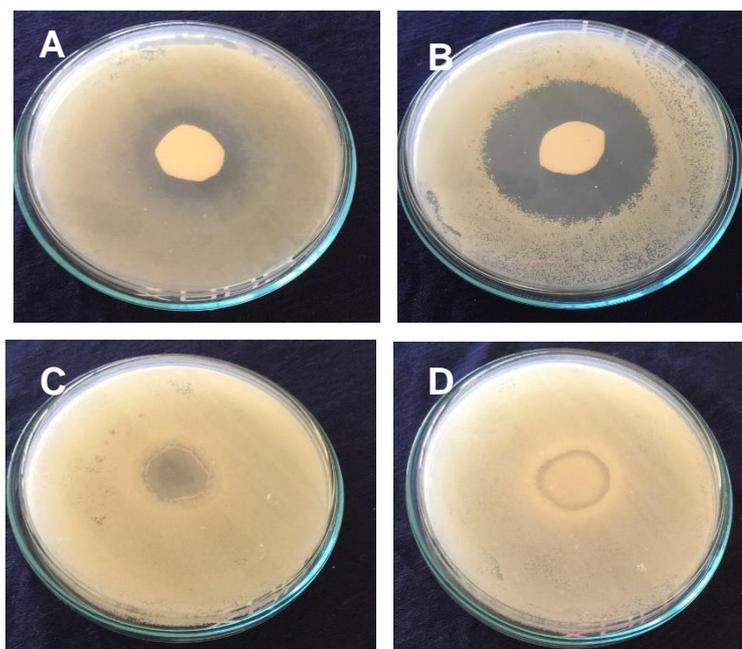
O controle da espessura é um parâmetro importante de se avaliar, pois reflete a repetibilidade e homogeneidade das embalagens, sendo difícil obter alta uniformidade na produção de filmes pela técnica de *casting* (Sobral, 1999). Os filmes contendo orégano, alecrim e o controle apresentaram espessura média de 0,203, 0,165 e 0,117 mm, respectivamente, demonstrando que a incorporação dos óleos essenciais, aumentaram a espessura dos filmes, corroborando com as características de Ugalde, (2014), onde o autor estuda blendas poliméricas obtidas de quitosana e amido de milho com incorporação de óleo essencial de orégano e cravo-da-índia. Mohammad et al., (2012) relatam em seu estudo sobre filmes de quitosana e amido que os valores médios de espessura foram de 0,20 mm, através da técnica de *casting*. Abdollahi, Rezaei e Farzi (2012) apresentam valores menores de espessura do que é reportado no presente trabalho, variando de 0,049 e 0,052 mm para filmes de quitosana adicionados de óleo essencial de alecrim e nanoargila de montmorilonita (MMT).

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE

Em relação à atividade antimicrobiana dos filmes, o filme contendo orégano (FO) apresentou maior halo de inibição contra *S. aureus* e *E. coli*, obtendo diâmetro médio de 3 cm e 4,7 cm, respectivamente, em comparação com filme incorporado com alecrim (FA) que apresentou halo de inibição de 2 cm contra *E. coli* e 1,8 cm contra *S. aureus*, e sem óleo essencial (FC), que não apresentou efeito bactericida contra os microrganismos em estudo, conforme apresentado na Figura 5. Comportamento similar foi relatado por Seydrim e Sarikus (2006), onde o óleo de orégano na concentração de 2% em filmes de proteína do soro do leite, possuiu maior poder antibacteriano contra *S. aureus*, *L. monocitogenes*, *E. coli* e *Lactobacillus plantarum*, em comparação com os filmes contendo óleo de alecrim.

O efeito negativo do filme controle pode estar relacionado com a dificuldade em que a quitosana e gelatina apresentaram em difundir-se pelo meio, através da técnica de difusão de disco, fazendo com que os microrganismos pudessem desenvolver-se livremente ao redor do filme. Fato semelhante foi reportado por Ojagh et al., (2010) e Hafsa et al., (2016) com filmes de quitosana.

Figura 5 – Halos de inibição dos filmes de gelatina e quitosana: A (F.O) contra *E.coli*, B (F.O), C (F.A) e D (F.C) contra *S. aureus*



Fonte: Autoria Própria, 2017.

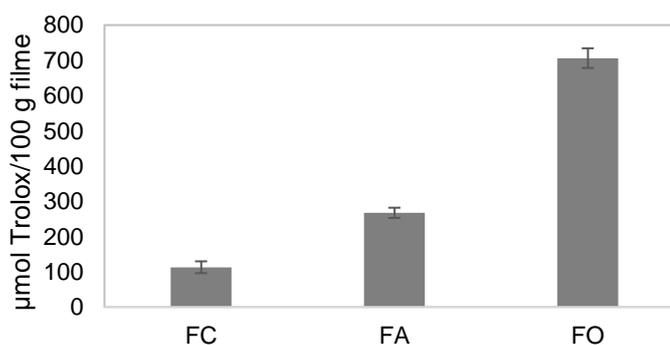
Bonilla e Sobral (2016) obtiveram resultados contra *S. aureus* e *E. coli* significativos utilizando filmes de quitosana e gelatina incorporados com óleo de alecrim, sendo que os halos de inibição variaram de 23 a 26 mm. Gómez-Estaca et al. (2010) relataram que filmes à base de gelatina de pele de peixe com adição de óleo essencial de orégano, apresentou ampla capacidade inibitória contra diferentes microrganismos deteriorantes de alimentos, indicando que sua utilização se torna promissora, visando um aumento de vida útil de alimentos.

Hafsa et al., (2016), estudaram propriedades antimicrobianas de filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de *Eucalyptus globulus* nas concentrações de 1% à 4%, contra *S. aureus*, *E. coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*, e observaram que a medida que as concentrações de óleo aumentavam, os halos de inibição apresentavam valores maiores para as bactérias, obtendo maiores valores para *E. coli* que variou de 54,53 à 153,37 mm².

Ojagh et al., (2010) obtiveram valores significativos de halos de inibição contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, utilizando filmes de quitosana com óleo essencial de canela na concentração de 2%, sendo que para a bactéria *L. sakei*, apresentou maior halo, no valor de 57,23 mm².

Com relação a atividade antioxidante dos filmes, determinada pelo método DPPH, verificou-se que o filme controle e com adição de óleo de alecrim apresentaram baixa capacidade antioxidante quando comparado com o filme adicionado de orégano (Figura 6), porém ainda houve certa atividade antioxidante mesmo sem ter adição de óleos essenciais, e pode estar relacionado com os grupamentos amino presentes em sua estrutura que possivelmente reagiu com os radicais livres (YUAN; CHEN; LI, 2016).

Figura 6 - Atividade antioxidante dos filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleo essencial de alecrim e orégano.



Fonte: Autoria Própria, 2017.

O maior valor de atividade antioxidante de FO corrobora com os resultados de atividade antimicrobiana apresentada anteriormente. Tal característica pode ser explicada pelo fato do óleo de orégano possuir maior quantidade de compostos fenólicos, como timol e carvacrol (BOUNATIROU et al., 2007)

Estudos realizados por Takayama et al.,(2016), relatam que o óleo essencial de alecrim apresentou capacidade antioxidante por possuir 28,5% de cineol, 27,7% de cânfora e 21,3% de alfa-pineno em sua composição, e os autores indicam que os monoterpenos são principais responsáveis pela ação antioxidante do mesmo. Neste trabalho, diferentemente do óleo de orégano, uma concentração maior de óleo de alecrim seria necessário adicionar nos filmes para poder visualizar uma atividade antimicrobiana e antioxidante significativa.

5.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Adequadas propriedades mecânicas e de barreiras são requeridas em uma embalagem com a função de proteger a integridade do alimento e garantir uma maior vida útil do mesmo. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de propriedades mecânicas, em termos de resistência máxima a tração (T), alongação na ruptura (E) e módulo de Young (MY), de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e perfuração relacionados à distância (mm) e força necessária para romper os filmes (mm).

Tabela 1 – Propriedades mecânicas de filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais

Formulação	T (MPa)	E (%)	MY (MPa)
FC	16,9 ± 2,7 ^a	50,5 ± 18,2 ^a	253,8 ± 29,1 ^a
FO	10,0 ± 2,9 ^b	58,0 ± 15,3 ^a	115,7 ± 11,1 ^c
FA	16,7 ± 2,5 ^a	59,0 ± 13,1 ^a	224,8 ± 9,33 ^b

Fonte: Autoria Própria, 2017.

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$), pelo teste de Tukey.

O filme FC apresentou resistência à tração de 16,9 MPa, alongação de 50,5 % e módulo de Young de 253,8 MPa rigidez. Valores superiores foram encontrados por Hosseini et al (2015) em filmes de gelatina e quitosana, possivelmente devido à diferença na proporção das mesmas. Liu et al., (2012), explica que as interações que ocorrem entre gelatina e quitosana são fortes devido a ligações de hidrogênio e a formação de complexos entre ânios e cátions dos dois polímeros, sugerindo que a quitosana apresenta grupos mais reativos auxiliando na interação com gelatina, fortalecendo o filme.

A partir dos dados obtidos, têm-se que a adição de óleo essencial de orégano causou uma redução média de 62,5 % na resistência a tração e de 45,5% no módulo de Young. Isso pode ser atribuído ao efeito plastificante do óleo de orégano que causou a uma redução na interação polímero-polímero, conduzindo à descontinuidade da matriz do filme. A redução da continuidade e da falta de coesão da estrutura do filme reduz, desta forma, a resistência a tração (TONGNUANCHAN et al., 2015). Para a alongação na ruptura não foi verificado diferença significativa entre as amostras. Comportamento similar foi reportado por Hosseini et al., (2015) em filmes compósitos de gelatina e quitosana adicionados de diferentes concentrações de óleo de orégano.

A incorporação de óleo de alecrim não afetou de forma significativa as propriedades mecânicas dos filmes. Entretanto, Bonilla e Sobral (2016) encontraram valores de alongação maiores com filmes de quitosana e gelatina adicionados de diferentes extratos etanólicos, incluindo o de alecrim que foi de 61 %, valor levemente superior do reportado no presente trabalho, que foi de 59%.

Chen et al., (2016), incorporaram diversas concentrações de nanoemulsão de óleo de canela em filmes de quitosana e observaram que os valores de módulo de Young e tração decaíram em comparação com o filme de quitosana sem adição de óleo. Benevides et al., (2012), produziram filmes de alginato com adição de óleo essencial de orégano em concentrações que variaram de 0,5 a 1,5 %, onde suas propriedades de alongação apresentaram maiores valores a medida que aumentava a concentração de óleo (2,2 a 3,7%), e no teste de tração os valores decaíram conforme adicionava-se o óleo essencial, variando de 71,0 MPa do filme controle a 31,1 MPa, com 1,5% de óleo.

Pelissari et al., (2009), reportaram que a adição de óleo de orégano em filmes de amido de mandioca e quitosana apresentaram menores valores de

resistência à tração e módulo de Young com incorporação de óleo, porém, maior alongação, enfatizando semelhança com o presente trabalho.

5.4 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA, UMIDADE E SOLUBILIDADE

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade e umidade dos filmes estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – PVA, solubilidade e umidade de filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais.

Formulação	PVA x 10 ⁷ (g/h.m.Pa)	Solubilidade (%)	Umidade (%)
FC	2,17±0,25 ^b	66,50 ± 3,76 ^a	5,07±2,43 ^a
FO	3,25±0,12 ^a	53,37 ± 3,91 ^b	5,22±1,02 ^a
FA	2,45±0,22 ^{a,b}	68,01 ± 1,31 ^a	5,09±2,34 ^a

Fonte: Aatoria Própria, 2017.

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$), pelo teste de Tukey.

Para PVA, o filme FO se sobressaiu, apresentando maior valor em relação às demais formulações. Esta característica também foi observada no filme FA, fato discrepante do reportado por Gallo et al., (2000) onde os autores enfatizam que a adição de substâncias hidrofóbicas como óleos essenciais diminui a interação da matriz do filme com moléculas de água, conferindo um caráter mais hidrofóbico.

O incremento na PVA também foi observado em filmes de gelatina de peixe e quitosana adicionados de óleo de orégano (HOSSEINI et al., 2015), filmes de gelatina e quitosana adicionados de diferentes extratos vegetais (BONILLA e SOBRAL, 2016) e filmes de proteína de soro com diferentes concentrações de soro de leite (OLIVEIRA, 2013). Provavelmente, os óleos essenciais não conseguiram se ligar quimicamente com os polímeros constituintes (gelatina e quitosana) fazendo surgir zonas de descontinuidade na matriz polimérica que provocou a perda de coesão do filme e assim facilitou a difusão de vapor de água (BONILLA e SOBRAL, 2016).

Wong et al., (1992), formularam filmes de quitosana a 1% pela técnica de *casting* e adicionaram ácido palmítico e estudaram os efeitos que este ácido graxo causou, que consistiu no aumento da permeabilidade ao vapor de água que pode ser explicado pela heterogeneidade da matriz do filme. Tognuanchan et al. (2015), reportaram que filmes a base de gelatina com incorporação de óleo de palma apresentaram redução significativa na PVA, utilizando concentrações de 25 a 75% de substância hidrofóbica.

A solubilidade em água dos filmes variou de 53,37 a 68,01%, e valores próximos foram encontrados por Hosseini et al. (2015). O filme FO apresentou solubilidade significativamente maior que as demais amostras. Este fato pode estar associado com o enfraquecimento da interação proteína-polissacarídeo em virtude da adição do óleo essencial, aumentando o fenômeno de lixiviação conforme reportado por Gómez-Estaca et al., (2010).

O valor de umidade dos filmes não diferiram estatisticamente, diferente do reportado por Hafsa et al., (2016) que demonstraram em seu estudo que o teor de umidade dos filmes de quitosana com óleo essencial de eucalipto apresentou diminuição significativa, apresentando também baixa solubilidade em água (30,92%).

5.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO

Os presuntos embalados a vácuo contendo filmes de quitosana e gelatina com e sem adição de óleos essenciais foram submetidos ao armazenamento refrigerado durante 35 dias. A partir da Figura 7, nota-se a aparência das fatias de presunto no momento em que foram embalados em sacos plásticos e selados a vácuo. O filme FO, logo ao ser embalado com o presunto apresentou coloração esbranquiçada e os filmes FC e FA incharam ao entrar em contato com o presunto possivelmente devido a migração de água do presunto para o filme.

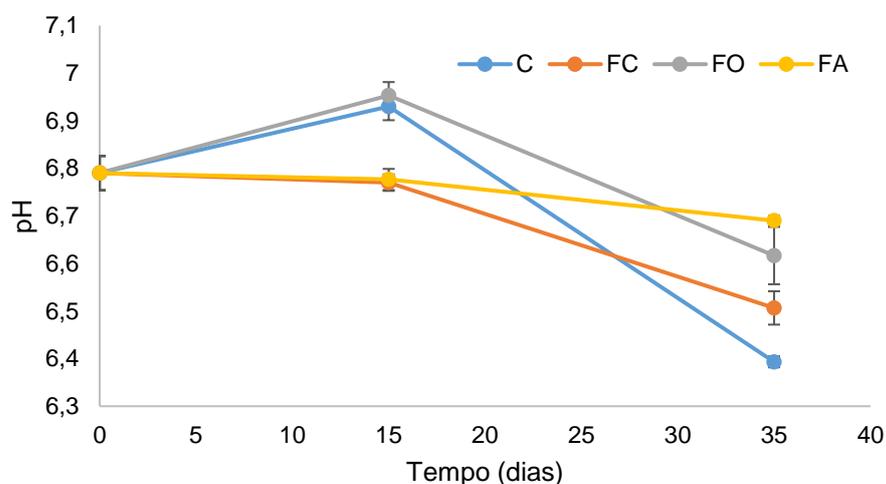
Figura 7- Presunto recoberto com os filmes FC, FO e FA e embalado a vácuo



Fonte: Autoria Própria, 2017.

Os valores do pH de presuntos embalados à vácuo com embalagens biodegradáveis e armazenados durante 35 dias estão apresentados na Figura 8. Foi possível observar que até 15 dias de armazenamento os valores de pH foram estatisticamente iguais, indicando que possivelmente o método de acondicionamento a vácuo ajudou a manter as características iniciais do produto. Após 35 dias, o pH dos tratamentos apresentaram diferenças entre si, sendo que os menores valores foram para as amostras C (6,39) e FC (6,51). Tal fato pode ser explicado devido à presença dos óleos essenciais na composição dos filmes, visto que eles possuem caráter antimicrobiano e antioxidante, fazendo com que não fosse possível o desenvolvimento de bactérias lácticas que compõem um grupo de bactérias responsáveis por produzirem ácidos orgânicos, contribuindo para a diminuição do pH e causar sabores e odores desagradáveis aos produtos cárneos (KORKEALA; MAKELA, 1989). Valores baixos de pH podem ocasionar a oxidação da mioglobina interferindo também na cor do produto.

Figura 8 – Valores de pH de presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais.



Fonte: Autoria Própria, 2017.

De acordo com Fernandes (2015), o valor de pH de linguiças acondicionados em embalagem ativa contendo óleo essencial de orégano, teve uma redução não acentuada em comparação com o tratamento controle realizado pelo autor.

Avaliando o efeito do tempo de armazenamento, verificou-se que o pH das amostras FO e FA manteve-se constante, sugerindo que os óleos essenciais proporcionaram um efeito protetivo ao presunto durante 35 dias de armazenamento. Rodrigues (2015), embalou presunto fatiado com laminados de amido e PLA com e sem nanopartículas de prata e obteve valores de pH menor que 6, o que pode auxiliar na alteração da cor do produto cárneo.

A estabilidade oxidativa dos presuntos embalados a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais foi avaliada pela determinação do índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e os resultados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de Oxidação lipídica do presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais

Tempo (dias)	C	FC	FO	FA
0	0,66±0,097 ^{aB}	0,66±0,097 ^{aB}	0,66±0,097 ^{aB}	0,66±0,097 ^{aB}
15	0,82±0,07 ^{aA,B}	0,80±0,17 ^{aB}	0,90±0,11 ^{aB}	0,85±0,15 ^{aAB}
35	0,96±0,07 ^{bA}	1,16±0,04 ^{aA}	1,01±0,05 ^{abA}	1,08±0,09 ^{abA}

Fonte: Autoria Própria, 2017.

Letras minúsculas na linha e letras maiúscula na coluna iguais não apresentam diferença, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Durante os 15 dias de armazenamento não houve alteração significativa nos valores de oxidação lipídica do presunto. Após 35 dias de armazenamento os maiores valores de oxidação lipídica foram observados nas amostras FC, FO e FA. Embora os filmes FC, FO e FA tenham apresentado atividade antioxidante (Figura 6), a partir dos resultados de oxidação lipídica não foi possível observar um efeito antioxidante dos filmes quando aplicados como embalagem ativa para presunto.

Ao final do armazenamento as amostras C e FC começaram a apresentar pequenas manchas de fluorescência. De acordo com Frankel (1984), a fluorescência é formada pela reação de produtos secundários da oxidação, como o malonaldeído, que é um agente forte de ligação cruzada, com grupamentos amino de proteínas e DNA. Desta forma, pode-se inferir que a oxidação lipídica do presunto está relacionada com o surgimento de manchas de fluorescência.

Entretanto, neste trabalho não foi verificado tal comportamento, pois as amostras FO e FA apresentaram maiores valores de oxidação lipídica, mas não verificou-se a presença de manchas de fluorescência em sua superfície. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato do óleo presente no filme ter migrado para o presunto, ter sofrido reações de oxidação durante o armazenamento e estes compostos também foram quantificado no momento da análise.

Torres e Okani (1997) evidenciam que valores de TBARS até 1,59 mg de malonaldeído/kg de produto são incapazes de causar alterações sensoriais perceptíveis e de saúde ao consumidor, deixando evidente que o presente trabalho encontra-se dentro dos limites descritos acima. Já Greene e Cumuze (1981), estabelecem que 2,0 mg malonaldeído/kg é aceitável em produtos cárneos.

Os parâmetros de cor, expressos em termos de L*, a* e b*, estão descritos na Tabela 4. Foi possível observar que durante os 15 dias de armazenamento não

houve diferença significativa entre as amostras para todos os parâmetros avaliados. Após 35 dias, para o parâmetro L* (luminosidade), o FC se mostrou menor, enquanto que os outros tratamentos aumentaram os valores, indicando que os presuntos estavam com coloração mais clara.

Tabela 4 – Parâmetros de cor do presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais

		Tempo (dias)		
		0	15	35
L*	C	67,13±1,12 ^a	66,63±1,70 ^a	69,33±1,96 ^a
	FC		66,00±1,75 ^a	65,20±1,24 ^c
	FO		66,28±1,48 ^a	67,67±1,49 ^{a,b}
	FA		65,90±1,46 ^a	66,93±1,46 ^{b,c}
a*	C	6,24±0,74 ^a	6,05±1,27 ^a	6,56±1,00 ^a
	FC		6,32±0,72 ^a	6,42±0,67 ^{a,b}
	FO		6,27±0,65 ^a	5,41±0,57 ^{b,c}
	FA		6,20±0,59 ^a	4,63±1,14 ^c
b*	C	9,42±0,38 ^a	9,88±0,41 ^a	11,09±0,49 ^a
	FC		9,90±0,51 ^a	10,83±0,36 ^{a,b}
	FO		9,81±0,39 ^a	11,14±0,40 ^{a,c}
	FA		9,59±0,50 ^a	10,34±0,55 ^{b,c}

Fonte: Aatoria Própria, 2017.

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

De uma forma geral, ao final do armazenamento houve alteração na coloração do presunto, independente do tipo de filme utilizado. A coloração vermelha (a*) teve redução e a coloração amarela (b*) teve elevação e pode estar relacionada com a oxidação lipídica e com a oxidação dos pigmentos. O nitrosohemocromo, pigmento característico de produtos cárneos cozidos curados, pode ter oxidado para metamioglobina desnaturada ou houve a formação de porfirinas oxidadas (coloração verde, amarelo ou incolor).

Os resultados da contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e da contagem total de bactérias lácticas estão na Tabela 5.

Tabela 5 – Contagem de microrganismos mesófilos e bactérias lácticas em presunto embalado a vácuo com filmes de gelatina e quitosana contendo óleos essenciais.

Mesófilos (UFC/g)	0	15 dias	35 dias
C	73	$2,8 \times 10^3$	>10
FC	-	25	>10
FO	-	>10	>10
FA	-	75	>10
Bactérias lácticas (UFC/g)	0	15 dias	35 dias
C	30	>10	$1,3 \times 10^3$
FC	-	>10	25
FO	-	>10	>10
FA	-	>10	5

Fonte: Autoria Própria, 2017

Durante o armazenamento refrigerado por 35 dias, não foi possível visualizar diferença entre os tratamentos para os microrganismos mesófilos. Para as bactérias lácticas, a amostra C apresentou maior contagem com relação às demais, sugerindo um leve efeito protetivos dos filmes no desenvolvimento de bactérias lácticas.

De acordo Slongo (2008), as bactérias ácido lácticas são microrganismos deteriorantes de produtos cárneos cozidos refrigerados à vácuo, causando características indesejáveis aos produtos. No presente trabalho, a contagem de bactérias lácticas foi baixa e com evolução lenta comparada com (GEITENES et al., (2013) que obteve crescimento das bactérias em 7 log UFC/g aproximadamente 45 dias de armazenagem de presunto a vácuo.

Rodrigues (2015) utilizou embalagens biodegradáveis contendo nanopartículas de prata em presunto fatiado e obteve aumento dos valores de aeróbios mesófilos durante 10 dias sob refrigeração, o valor encontrado para o tempo de 0 dias foi de $1,4 \times 10^4$, e apresentou-se incontável as unidades formadoras de colônias no tempo de 10 dias.

Menezes (2016), aplicou óleo essencial de orégano na superfície de presunto fatiado e embalou à vácuo, deixando armazenado durante 45 dias a 6°C e obteve valores reduzidos de contagem de bactérias lácticas, onde não atingiram concentrações maiores que $9,0 \times 10^5$ UFC/g.

Bressan et al., (2007) apresentaram em seu estudo utilizando embalagens com atmosfera modificada, valores reduzidos de contagem de aeróbio mesófilos em presunto, que foi de 2×10^2 UFC/g sob atmosfera modificada e $< 10^1$ UFC/g para presuntos a vácuo.

6 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível a produção de filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana incorporados de óleos essenciais de orégano e alecrim com boa manuseabilidade, considerável resistência a tração e alongação na ruptura. Entretanto somente o filme contendo óleo de orégano apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* e relevante potencial antioxidante.

A aplicação do filme contendo óleo de orégano em presunto embalados a vácuo auxiliou na redução da contagem de bactérias lácticas, mas não foi possível verificar o seu efeito antioxidante após 35 dias de armazenamento. Assim, estudos adicionais ainda são necessários para viabilizar a aplicação de filmes de gelatina e quitosana ativos em alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of food engineering**, v. 111, p. 343-350, 2012.
- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, 99, 1359-1367. 2008
- AGULLÓ, E.; RODRÍGUEZ, M. S.; RAMOS, V.; ALBERTENGO, L. Present and future role of chitin and chitosan in food. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 521-530, 2003.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis: 930.04. Moisture content in plants**, 1, 40. 1990.
- ARFA, A. B. et al. Coating papers with soy protein isolates as inclusion matrix of carvacrol. **Food Research International**, 40, n. 1. 22-32. , 2007.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test methods for water vapor transmission of materials. ASTM E96-00**, Philadelphia, 8. 2000.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-00**, Philadelphia, 08.01, 9. 2001.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test method for slow rate penetration resistance of flexible barrier films and laminates. ASTM F1306-90 (Reapproved 1998)**, Philadelphia, 15.09, 4. 2001.
- AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. D. A. F.; AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 20, n. 3, 2000.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil- A review. **Science Direct**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of food engineering**, v. 110, p. 232-239, 2012.
- BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 149f. 2003.

BIGI, A. et al. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. **Biomaterials**. v.19, p.2335-2340, 1998.

BITENCOURT, C. M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes à base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (Curcuma longa L.)**. Universidade de São Paulo. Pirassununga, p. 107f. 2013.

BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, 16, 17-25. 2016.

BONILLA, J., ATARÉS, L., VARGAS, M., CHIRALT, A.,. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids** 26, 9–16. 2012

BOUNATIROU, S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, v. 105, p. 146-155, 2007.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oil of some Laminaceae Spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 1822-1828, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 20, de 31 de julho de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de presunto. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 03 ago. p.7. 2000.

BRESSAN, M. C. et al. Influencia da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. **Ciênc. agrotec**, v. 31, n. 2, p. 433-438, 2007.

BRUNA, J. M.; ORDÓÑEZ, J. A.; FERNÁNDEZ, M.; HERRANZ, B.; de la HOZ, L. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. **Meat Science**, Oxford, v.59, p.87-96, 2001

BURT, S. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in food - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CHEN, H. et al. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 662-671, 2016.

CHIOU, B.-S. et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradable properties. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 3748-3753, 2008.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extend shelf life of meat-based products. **Science Direct**, França, 78, 90-103. 2008.

CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L. D. Aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, 4, n. n. 23,. 54-63. 1986.

CORNFORTH, D. Colour meat – its basis and importance. In Pearson, A.M. & DUTSON. T.R. (ed) – **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish product – Advances in meat research series**, vol.9, Black Academic & Professional, cap.2, p. 34 –78, 1994.

CUQ, B. et al. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 114, n. n. 4, p. 1173-1182, 1995.

DAPKEVICIUS, A. et al. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. **J. Sci. Food Agric.**, v. 77, p. 140-146, 1998.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, Londres, 114, n. n. 4, 1173-1182. 2009.

EBURNE, R. C.; PRENTICE, G. Modified atmosphere packed ready to cook and ready to eat meat products. In MAN, C. M. D.; JONES, A. A. **Shelf life evaluation of foods**, ed. Chapman e Hall, p. 156-178, 1996.

ELSABEE, M. Z.; ABDU, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Material Science and Engineering**, 33,. 1819-1841.2013.

FERNANDES, Rui Pedro Félix Baptista. **A valiação do potencial de revestimentos de origem proteica incorporados com extratos e/ou óleos essenciais de plantas aromáticas na preservação de produtos cárneos**. 130f. Dissertação (Segurança Alimentar)- Universidade de Coimbra, Coimbra. Set, 2015.

FLAMINI, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCHIA, M., CECCARINI, L., Main agronomicproductive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 3512–3517. 2002.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. **Agricultural Research service**, v. 61, n. 12, 1984.

GALLO, J.-A. Q. et al. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 37-46, 2000.

GEITENES, S. et al. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido fatiados e embalados a vácuo. **Ciência exatas e naturais**, v. 15, n. 1, p. 113-133, 2013.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L. Moisture adsorption by grain protein films. **Transactions of ASAE**, 37, n. 2, 1994. 535-539.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. **Food Hydrocolloids**, Madrid, 23, 1334-1341. 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Hydrocolloids**, Spain, 27, 889-896. 2010.

GONTARD, M.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, 1992.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 30, n. 1, 3-15. 1996.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, p. 539-546, 1978.

GREENE, B. E.; CUMUZE, T. H. Relationship between TBA numbers and inexperienced panelists assessments of oxidized flavor in cooked beef. **Journal of food science**, v. 47, 1981.

HAFSA, J. et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. **LWT- Food science and technology**, v. 68, p. 356-364, 2016.

HOLLEY, R. A. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packaged cured meats. **Food Microbiology**, v. 14, p. 201-211, 1997.

HOSSEINI, F. et al. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, 136, 1490-1495. 2013.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. Essential oil. **Industrial Crops and Products**, v.67.p. 403-413, 2015.

JRIDI, M. et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 373-379, 2014.

KADRI, A. et al. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 29, n. 5, p. 6502-6508, 2011.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, 107, 845-852. 2008.

KANNER, J. Oxidative process in meat and meat products: Quality implications. **Meat Science**. v. 36, p.169-189, 1994.

KARIM, A. A.; BHART, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, 23, 563-576. 2009.

KORKEALA, H.; MAKELA, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. **International Journal of Food Microbiology**. v.9, p.33-43, 1989.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, 51, n. 2, 1997. 60-74.
KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, p. 63-81, 1992.

LIU, L.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Effect of food ingredients and select lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. **International Journal of Food Science and Technology**, Irlanda, v. 41, p. 295-302, 2006.

LIU, Z. et al. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 311-317, 2012.

LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. **Química Nova**, 37, n. n. 6, 931-936. 2014.

MARANGON, C. A. et al. Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, 99,. 163-171. 2017

MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation, **Journal of Cleaner Production**.p833-839. 2004.

MELO, A. A. M. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (Rosmarinus officinalis L.) na conservação de carnes de frando desfiado.** Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 67f. 2010.

MENEZES, Natielle Maria Costa. **Efeito da adição de óleo essencial de orégano sobre a vida útil de presunto fatiado a vácuo: modelagem em condições isotérmicas e não isotérmicas.** 78f. Dissertação (Engenharia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MOHAMMAD, O. T. et al. Modification of mechanical and thermal property of chitosan-starch blend films. **Radiation physics and chemistry**, v. 81, p. 1659-1668, 2012.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Suscptibility Tests for Bacteria. **National Committe for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, PA, USA, p. 8. 2003.

OJAGH, S. M. et al. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 120, p. 193-198, 2010.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of Rosmarinus officinalies L. obtaines by hidrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, S. P. L. F. **Avaliação da aplicação de óleo essencial de orégano em filme de proteína de soro do leite.** Iondrina: Mestrado em ciência e tecnologia do leite, 54 p. 2013.

OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: SHIMOKOMAKI, M. et al. (Ed.). **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes.** São Paulo: Varela, cap. 15, p. 155-162 2006.

TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, v. 243, p. 68-76, 1997.

PAGNO, C. H. **Efeito da adição de nanoestruturas, óleos essenciais e quitosana no desenvolvimento de filmes e coberturas biodegradáveis com propriedades antimicrobianas**. 177f Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. . 2016.

PELLISSARI, F. M. et al. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, p. 7499-7504, 2009.

PERINEAU, F.; GANOU, L.; VILAREM, G. Studying Production of Lovage Essential Oils in a Hydrodistillation Pilot Unit Equipped with a Cohobation System. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 53, p. 165-171, 1992.

RAVI-KUMAR, M. N. V. A review on chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, 46,. 1-27. 2000

ROMANI, V. P.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; MARTINS, V. G. Active and sustainable material from rice starch, fish protein and oregano essential oil for food packaging. **Industrial Crops and Products**, Rio Grande do Sul, 97,. 268-2742016.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PERES-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado técnico: EMBRAPA**, 2007.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. Propriedades de barreira. In: _____ **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

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

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 536p. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVEIRA, S.M.; JUNIOR, A. C.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R. W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. **Ciência Rural**, v.42, p. 1300-1306, 2012.

SHIH, F. F. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chemistry**, Campinas, 73, n. n. 3,. 406-409. 1996

SHOGREN, R. L.; BAGLEY, E. B. Natural polymers as advanced materials: Some research needs and directions. **American Chemical Society**, Washington, 1999.

TAKAYAMA, C. et al. Chemical composition of Rosmarinus officinalis oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 6, p. 677-681, 2016.

TONGNUANCHAN, P. et al. Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, 48, 2015. 248-259.

UGALDE, Mariane Lobo. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 168f. Tese (Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai, Erechim, jun, 2014.

VELDHUIZEN, E. J. A. et al. Structural Requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 1874-1879, 2006.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/Lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 7218-7225, 2010.

WONG, D. W. S.; GASTINEAU, F. A.; TILLIN, S. J.; GREGORSKI, K. S.; PAVLATH, A. E. Chitosan-Lipid Films: Microstructure and Surface Energy. **J. Food Chem.** V.40.p.540-544, 1992.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. **Food Research International**, 89, 117-128. 2016.