

Rodrigo Battisti

**DESENVOLVIMENTO DE FOLHA CELULÓSICA COM
REVESTIMENTO BIODEGRADÁVEL E AÇÕES
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE PARA USO COMO
EMBALAGEM ATIVA EM CARNE BOVINA FRESCA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri

Coorientador: Prof. Dr. Nei Fronza

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Battisti, Rodrigo

Desenvolvimento de folha celulósica com revestimento biodegradável e ações antimicrobiana e antioxidante para uso como embalagem ativa em carne bovina fresca / Rodrigo Battisti; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri; coorientador, Nei Fronza. - Florianópolis, SC, 2016.

104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Embalagens ativas. 3. Revestimento. 4. Biopolímeros. 5. Carne bovina. I. Novy Quadri, Mara Gabriela. II. Fronza, Nei. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Rodrigo Battisti

**DESENVOLVIMENTO DE FOLHA CELULÓSICA COM
REVESTIMENTO BIODEGRADÁVEL E AÇÕES
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE PARA USO COMO
EMBALAGEM ATIVA EM CARNE BOVINA FRESCA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.

Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Soares (Coordenadora)
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Mara Gabriela Novy Quadri (Orientadora)
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Nei Fronza (Coorientador)
Instituto Federal Catarinense – IFC

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Haiko Hense
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Bortolini Foralosso
Instituto Federal Catarinense – IFC

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui minha imensa gratidão aos meus pais Mercio e Lara pelo apoio e incentivo dados durante todos os momentos de realização deste trabalho, e acima de tudo, pelo amor incondicional.

A professora Mara Gabriela Novy Quadri, pela orientação, pelo grande aprendizado e pela confiança depositada em mim que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao professor, tio e coorientador Nei Fronza, por participar intensamente na concretização deste trabalho, por todo o incentivo, pela dedicação e pelos sábios conselhos. Estendo meus agradecimentos ao professor Álvaro Vargas Júnior pelo auxílio no decorrer deste trabalho.

A todos os professores do PósENQ que com seus saberes contribuíram para minha formação científica.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Instituto Federal Catarinense pela oportunidade, suporte e estrutura oferecida.

Aos membros da banca de avaliação, por aceitarem o convite e se disponibilizarem a analisar este trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Sistemas Porosos: Stéphanie, Valdir, Rafael, Andressa, Carina, Camila, Taysnara, Deise, Diego, Fábio, Vivian, Eduardo e Helena pelo auxílio, colaboração e pelos momentos de diversão que tornaram a convivência prazerosa.

Agradeço também a professora Sheila e aos bolsistas do Instituto Federal Catarinense do campus Concórdia Tiago, Marina e Gabriela, pelo auxílio nas análises microbiológicas.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e me apoiaram durante esta jornada.

Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.

(John Dewey)

RESUMO

Nos últimos anos a cadeia de distribuição de alimentos vêm apresentando grandes transformações que têm estimulado indústrias e pesquisadores a concentrarem esforços em dois grandes desafios: prolongar a durabilidade do produto acondicionado, mantendo suas características desejáveis ao consumo bem como sua qualidade nutricional e segurança microbiológica. Deseja-se ainda que estes sistemas de acondicionamento atendam às urgentes demandas de sustentabilidade minimizando os impactos ambientais causados pelo uso acentuado de materiais de origem não renovável. Dentro deste contexto, foram desenvolvidas embalagens celulósicas biodegradáveis revestidas com solução biopolimérica a base de gelatina reticulada com transglutaminase, glicerol e ácido cítrico para acondicionamento de carne bovina resfriada. Quatro tratamentos foram estudados: papel revestido com solução biopolimérica sem ácido cítrico, com ácido cítrico nas concentrações de 0,5 % (m/m) e 1,0 % (m/m), denominados papéis ativos, além do papel controle sem revestimento. As análises de espessura, gramatura e densidade aparente mostraram a formação da película de revestimento, comprovada por análise morfológica. O revestimento biopolimérico não melhorou as propriedades mecânicas dos papéis, reduzindo a resistência à tração e o alongamento na ruptura dos papéis revestidos. Já com relação às propriedades ópticas, os papéis mostraram um leve aumento na luminosidade e uma pequena diminuição na intensidade do tom amarelo. O revestimento biopolimérico reduziu significativamente a atividade de água dos papéis bem como a permeabilidade ao vapor d'água, parâmetros importantes para o controle microbiológico de alimentos. O teste de atividade antimicrobiana *in vitro* revelou halo de inibição de *Pseudomonas aeruginosa* apenas para o papel contendo 1,0 % (m/m) de ácido cítrico, que está relacionado à maior concentração de ácido cítrico migrada. O acondicionamento da carne bovina fresca na forma de hambúrgueres com os papéis desenvolvidos foi realizado afim de verificar a eficácia da embalagem diretamente no alimento. A contagem bacteriana total evidenciou uma diminuição na ordem de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos da população microbiana na carne embalada nos papéis ativos em comparação ao papel controle no último dia de armazenamento. As carnes embaladas nos papéis ativos apresentaram maior estabilidade à oxidação lipídica durante todo o período de armazenamento, mantendo a coloração vermelha (desejável) da carne, apresentando valores de pH significativamente inferiores ao da carne embalada no papel controle. Foi observado ainda uma redução no

teor de umidade da carne embalada no papel controle no último dia de armazenamento, enquanto a atividade de água não apresentou variações significativas durante o período de armazenamento. Sendo assim, os papéis revestidos com solução biopolimérica ativa se apresentam como uma alternativa viável para o acondicionamento de carne bovina fresca, tanto pelo aspecto da manutenção de suas propriedades sensoriais por um maior período de tempo, quanto por suas características de biodegradabilidade e sustentabilidade.

Palavras-chave: Embalagem ativa. Revestimento. Ácido cítrico. Carne.

ABSTRACT

In recent years the food distribution chain has shown great changes that have encouraged industries and researchers to focus efforts on two major challenges: to prolong the durability of the packaged product while maintaining their desirable characteristics for consumption as well as their nutritional quality and microbiological safety. It is desired also that these packaging systems meet the urgent demands of sustainability minimizing the environmental impacts caused by the heavy use of non-renewable source materials. In this context, biodegradable cellulosic packages coated with a biopolymeric solution based on industrial gelatin crosslinked with transglutaminase, glycerol and citric acid in order to condition fresh meat. Four treatments were studied, as follow: paper coated with a biopolymeric solution without citric acid, with citric acid in concentrations of 0.5 % (w/w) and 1.0 % (w/w), named active papers, and the uncoated control paper. Thickness, grammage and bulk density analysis demonstrated the effectiveness in forming the coating film, which was confirmed by morphological analysis. The biopolymeric coating did not show improvement in mechanical properties of paper, reducing the tensile strength and elongation at break of coated paper. In relation to the optical properties of the papers, it was observed a slight increase in brightness and a slight decrease in the yellowness. The biopolymeric coating reduced significantly the water activity of the paper and the water vapor permeability, important parameters for the microbiological control of food. *In vitro* antimicrobial activity test showed inhibition for *Pseudomonas aeruginosa* only for the paper containing 1.0 % (w/w) of citric acid, which is related to higher migrated concentrations. The packaging of fresh beef in papers as hamburgers was performed in order to verify the effectiveness of the package directly to the food. The total bacterial count showed a decrease in the order of approximately 3 log cycles of microbial population in the meat packaged with the active papers as compared to the control paper on the last day of storage. The packaged meat on active papers exhibit greater stability to lipid oxidation during the storage period, thereby maintaining its red color (desirable), as well as had showed significantly lower pH values compared with the meat packed in control paper. It was also observed a reduction in the moisture content of meat packed in control paper on the last day of storage, while no significantly variation on water activity of the meat was observed during the storage period. Thus, the coated papers with biopolymeric active solution are presented as a viable alternative to fresh beef packaging, both from the aspect of maintaining their sensorial

properties for an extended period, as for its biodegradability and sustainability characteristics.

Keywords: Active packaging. Coating. Citric acid. Meat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transferência de massa da substância ativa nas diferentes aplicações de sistemas de embalagens antimicrobianas.	36
Figura 2 – Representação esquemática da rede de ligações de hidrogênio presentes nas fibras de celulose do papel.	44
Figura 3 – Transformações mais comuns no pigmento da carne.	49
Figura 4 – Fluxograma do procedimento experimental realizado.	51
Figura 5 – Imagens das amostras dos papéis obtidos neste estudo.	65
Figura 6 – Fotomicrografias dos papéis PC, P1, P2 e P3 na vista superficial (a) com aumento de 200x, e na vista de corte transversal (b) com aumento de 800x.	66
Figura 7 – Atividade de água (a_w) dos papéis elaborados.	72
Figura 8 – Antibiógramas dos papéis controle (PC) e com 1,0 % de ácido cítrico (P3) contra <i>P. aeruginosa</i>	75
Figura 9 – Ensaio de migração do ácido cítrico para o meio simulante.	76
Figura 10 – Amostras de carne acondicionadas na forma de hambúrgueres: (a) aberta (b) após embalada com papel.	77
Figura 11 – Contagem bacteriana total (CTB) das carnes embaladas com os papéis PC, P2 e P3 ($T \cong 4\text{ }^\circ\text{C}$).	78
Figura 12 – Evolução dos níveis de TBARs durante o armazenamento ($T \cong 4\text{ }^\circ\text{C}$).	80
Figura 13 – Avaliação do pH das carnes embaladas com os papéis PC, P2 e P3 ($T \cong 4\text{ }^\circ\text{C}$).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Trabalhos disponíveis na literatura sobre revestimento de papéis com agentes ativos com aplicação para embalagens de alimentos.	26
Tabela 2 – Tipos de embalagens ativas com uso comercial para alimentos.	34
Tabela 3 – Substâncias ativas com atividade antimicrobiana, <i>versus</i> microrganismo alvo/suporte polimérico.	39
Tabela 4 – Aditivos antioxidantes empregados em embalagens ativas.	40
Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do ácido cítrico anidro.	41
Tabela 6 – Formulações dos revestimentos dos papéis ativos fabricados.	53
Tabela 7 – Resultados das análises das propriedades físicas dos papéis.	68
Tabela 8 – Ensaio de tração para o papel controle (PC) e para os papéis com revestimento (P1, P2 e P3), nas direções de máquina (DM) e transversal (DT).	69
Tabela 9 – Resultados dos parâmetros de cor L*, a* e b*, da variação de cor (ΔE), do índice de transparência (WI) e do índice de amarelamento (YI) dos papéis.	70
Tabela 10 – Resultados de permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos papéis.	73
Tabela 11 – Resultados dos antibiogramas de bactérias Gram positivas e Gram negativas com relevante importância em alimentos.	74
Tabela 12 – Diâmetros dos halos de inibição contra <i>P. aeruginosa</i>	75
Tabela 13 – Resultados dos parâmetros de cor L*, a*, b* e <i>Croma</i> (C*) para as carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 ($T \cong 4^\circ\text{C}$).	81
Tabela 14 – Resultados para a atividade de água (a_w) das carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 ($T \cong 4^\circ\text{C}$).	84
Tabela 15 – Umidade das carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 ($T \cong 4^\circ\text{C}$).	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Ácido cítrico
AgNP – Nanopartículas de prata
AM – Amido modificado
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 a_w – Atividade de água
BHA – Butilhidroxianisol
BHT – Butilhidroxitolueno
BPF – Boas Práticas de Fabricação
CBT – Contagem Bacteriana Total
CIE – *Commission Internationale de l'Eclairage*
CNF – Celulose nanofibrilada
DCMC – Dialdeído carboximetilcelulose
DM – Direção de máquina
DT – Direção transversal
DTA – Doenças transmitidas por alimentos
EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EVA – Etileno vinil acetato
FAO/WHO – *Expert Committee on Food Additives*
GRAS – *Generally Recognised as Safe*
GT – Glúten de trigo
HG – Hidrocloro de guanidina
HHP – Alta pressão hidrostática (*High hydrostatic pressure*)
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
MAP – *Modified atmosphere packaging*
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MIC – *Minimal inhibitory concentration*
MMT – Argila montmorilonita
MSP – Metabissulfito de potássio
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NNP – Nitrogênio não proteico
OE – Óleos essenciais
PE – Polietileno
PEBD – Polietileno de baixa densidade
PMS – Permanganato de sódio
PS – Poliestireno (*Polistirene*)
PSI – Proteína isolada de soja
PVA – Permeabilidade ao vapor d'água

PVC – Poli(cloreto de vinila)
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SIH – Sistema de Informações Hospitalares
SP – Sorbato de potássio
T – Temperatura
TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances*
TCA – Ácido tricloroacético
TCS – Triclosan
TSA – Ágar triptona de soja (*Trypticase soy agar*)
TSB – Caldo triptose de soja (*Tryptone Soya Broth*)
UFC.g⁻¹ – Unidade formadora de colônia por grama
UFC.mL⁻¹ – Unidade formadora de colônia por mL
WI – Índice de Transparência (*Whiteness index*)
YI – Índice de amarelamento (*Yellowness index*)
ΔE – Diferença total de cor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	25
1.1.1 Objetivo Geral	25
1.1.2 Objetivos Específicos.....	25
1.2 ESTADO DA ARTE	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	31
2.1.1 Segurança alimentar	32
2.2 EMBALAGENS ATIVAS	33
2.2.1 Embalagens ativas antimicrobianas	35
2.2.1 Embalagens ativas antioxidantes	38
2.2.1.1 Agentes ativos.....	39
2.2.1.1.1 <i>Ácido cítrico</i>	40
2.3 EMBALAGENS CELULÓSICAS E SUSTENTABILIDADE	43
2.3.1 Papel	43
2.3.2 Revestimento do papel	44
2.3.2.1 Gelatina e a enzima Transglutaminase.....	46
2.4 MICROBIOLOGIA DA CARNE	46
2.4.1 Micro-organismos deteriorantes em carnes.....	47
2.4.2 Micro-organismos patogênicos em carnes.....	48
2.5 PROCESSOS OXIDATIVOS EM CARNES	48
2.6 LEGISLAÇÃO PARA CARNE MOÍDA	49
3 METODOLOGIA	51
3.1 MATERIAIS	52
3.2 FABRICAÇÃO DOS PAPÉIS REVESTIDOS.....	52
3.2.1 Preparo das soluções biopoliméricas	52

3.2.2 Aplicação do revestimento no papel	53
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PAPÉIS	53
3.3.3 Morfologia de superfície	54
3.3.1 Propriedades físicas	54
3.3.1.1 Espessura	54
3.3.1.2 Gramatura	54
3.3.1.3 Densidade aparente do papel	54
3.3.2 Propriedades mecânicas	55
3.3.4 Propriedades ópticas do papel	56
3.3.5 Atividade de água (a_w) do papel	56
3.3.6 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)	57
3.3.7 Atividade antimicrobiana <i>in-vitro</i>	58
3.3.7.1 Ativação das cepas	58
3.3.7.2 Preparação do inóculo	58
3.3.7.3 Inoculação e incubação dos micro-organismos	59
3.3.8 Migração do ácido cítrico para o meio simulante	59
3.4 APLICAÇÃO DO PAPEL NA CARNE BOVINA E AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE QUALIDADE	59
3.4.1 Acondicionamento das amostras de carne	60
3.4.2 Avaliação dos índices de qualidade da carne acondicionada .	60
3.4.2.1 Contagem Bacteriana Total (CBT)	60
3.4.2.2 Avaliação da oxidação da carne	61
3.4.2.3 Avaliação da coloração da carne	62
3.4.2.4 Determinação do pH da carne	62
3.4.2.5 Determinação da atividade de água (a_w) da carne	62
3.4.2.6 Determinação da umidade da carne	63
3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65

4.1 CARACTERÍSTICAS VISUAIS DOS PAPÉIS.....	65
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PAPÉIS	66
4.2.1 Morfologia de superfície	66
4.2.2 Espessura, gramatura e densidade aparente	67
4.2.3 Propriedades mecânicas.....	68
4.2.4 Propriedades ópticas.....	70
4.2.5 Atividade de água (a_w)	71
4.2.6 Permeabilidade ao Vapor D'água – PVA.....	73
4.2.7 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	74
4.2.8 Migração do ácido cítrico para o meio simulante.....	76
4.3 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE QUALIDADE DA CARNE ...	77
4.3.1 Acondicionamento da carne	77
4.3.1 Contagem bacteriana total (CTB) na carne.....	78
4.3.2 Oxidação da carne.....	79
4.3.3 Coloração da carne.....	81
4.3.4 pH da carne.....	83
4.3.5 Atividade de água (a_w) da carne.....	84
4.3.6 Umidade da carne.....	85
5 CONCLUSÕES	87
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

As grandes transformações nos hábitos alimentares evidenciadas nas últimas décadas, decorrentes principalmente das mudanças no estilo de vida, têm estabelecido grandes desafios para os pesquisadores e para a indústria de alimentos. É notória a crescente demanda de consumidores que buscam cada vez mais por alimentos “prontos para comer”, porém sem deixar de exigir a manutenção das características sensoriais similares a de alimentos *in natura*, além da garantia da qualidade nutricional e segurança do alimento.

De fato, estas mudanças associadas às exigências dos modernos sistemas de distribuição têm favorecido o aparecimento de novas tecnologias de acondicionamento. Muitos avanços têm sido feitos no sentido de incorporar novas funções aos sistemas de embalagens como a criação das embalagens ativas, por exemplo, cuja concepção está voltada para a interação com o alimento acondicionado, de modo a prolongar a vida útil e manter a qualidade, segurança e as propriedades desejáveis para o consumo.

O conceito de embalagem ativa refere-se à incorporação de certos aditivos em sistemas de embalagem (no interior, ou mesmo incorporados nos próprios materiais da embalagem) que tem o objetivo de manter a qualidade e estender a vida de prateleira do produto (KERRY; O’GRADY; HOGAN, 2006). Dentre as inúmeras substâncias ativas já estudadas e aplicadas em carne, o ácido cítrico destaca-se como um agente antioxidante, capaz de prevenir a oxidação lipídica, que afeta de forma significativa as características da carne, bem como auxilia na manutenção da cor vermelha, parâmetro este de extrema importância na aceitação do produto. Além disso, o ácido cítrico é um agente antimicrobiano atóxico, considerado “GRAS” (*Generally Recognised As Safe*), atuando assim de forma a reduzir, inibir ou retardar o crescimento superficial de micro-organismos, prolongando a vida útil e, consequentemente, estendendo a vida de prateleira da carne.

Embora seja inquestionável a importância dos modernos sistemas de embalagens, a consciência do seu impacto no ambiente e as atuais regulamentações impõe a necessidade de prevenir a geração excessiva de resíduos de embalagens e de desenvolver a sua produção sustentável. O progressivo aumento na quantidade de resíduos gerados pelo descarte de embalagens tradicionais tem causado grande preocupação e impulsionado a busca por novos materiais e tecnologias menos agressivas ao meio ambiente, o que vem abrindo perspectivas estimulantes para as

embalagens celulósicas como o papel, principalmente devido aos seus aspectos inerentes de biodegradabilidade e sustentabilidade.

No entanto, para aplicação em alimentos, por questões de funcionalidade, o papel precisa ser revestido por materiais de origem fóssil, além do fato de que estes materiais melhoram suas propriedades mecânicas e de barreira (ZHANG; XIAO; QIAN, 2014), o que é necessário para utilização como embalagem. Biopolímeros oriundos de fontes renováveis, como a gelatina, por exemplo, apresentam potencial para substituir os revestimentos sintéticos atuais para papel, uma vez que oferecem vantagens ambientais favoráveis para reciclagem e reutilização (KHWALDIA et al., 2014).

Diante deste contexto, o desenvolvimento de uma embalagem celulósica revestida com gelatina, um biopolímero natural, com ação antioxidante e antimicrobiana devido à incorporação do ácido cítrico, se apresenta de forma promissora a atender às atuais demandas do mercado consumidor e às exigências ambientais. Pode-se dizer que esta embalagem poderá ser capaz de prolongar a vida de prateleira do alimento mantendo as características desejáveis para consumo e segurança microbiológica, bem como a minimizar o uso de matérias-primas de fontes não renováveis como o plástico, reduzindo desta forma o impacto gerado pelo excessivo descarte de resíduos de embalagens tradicionais ao meio ambiente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver um papel revestido com solução biopolimérica a base de gelatina industrial reticulada com enzima transglutaminase, contendo ácido cítrico como agente ativo. O papel revestido fornecerá ação multifuncional, antimicrobiana e antioxidante, para aplicação como embalagem ativa em carne bovina fresca.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver a formulação de uma solução biopolimérica ativa à base de gelatina, transglutaminase e ácido cítrico, visando aplicação como revestimento no papel;
- b) Determinar uma metodologia adequada para aplicação do revestimento ativo sobre o papel através da técnica de pulverização com ar comprimido;
- c) Produzir a embalagem de papel revestido com a solução biopolimérica contendo o aditivo antimicrobiano e antioxidante incorporado à embalagem;
- d) Caracterizar e avaliar as propriedades físicas, mecânicas, ópticas e de barreira dos papéis revestidos;
- e) Avaliar as interações com o alimento desta embalagem visando controle da atividade microbológica e oxidativa na carne.

1.2 ESTADO DA ARTE

Os principais trabalhos disponíveis na literatura referentes ao revestimento de papéis com agentes ativos antimicrobianos e antioxidantes para aplicação como embalagem de alimentos estão organizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Trabalhos disponíveis na literatura sobre revestimento de papéis com agentes ativos com aplicação para embalagens de alimentos.

Autor (ano)	Papel / Revestimento / Agente ativo	Resultados mais relevantes
Vartiainen et al. (2004)	Papel de cópia A3 (80 g/m ²) / Quitosana / Nisina, ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico.	<ul style="list-style-type: none"> • Melhora nas propriedades mecânicas; • A quitosana apresentou atividade antimicrobiana; • Nisina não aumentou a atividade antimicrobiana dos revestimentos; • Os revestimentos de quitosana em ácido láctico poderiam ser usados em embalagem de papel para alimentos.
Rodríguez, Batlle, e Nerín (2007)	Papel (80 g/m ²) / Parafina / Óleos essenciais (OE) de cravo, canela e orégano.	<ul style="list-style-type: none"> • O revestimento com OE de canela inibiu totalmente o crescimento de fungos, porém nenhuma inibição das bactérias Gram-positivas testadas; • OE de canela e de orégano mostraram atividade inibidora contra as bactérias Gram-negativas; • A % de OE teve influência significativa sobre a atividade antimicrobiana; • Proteção completa foi obtida durante 7 dias a 4 °C em morangos.
Arfa et al. (2007)	Papel comercial (70 g/m ²) / Proteína de soja isolada (PSI), amido modificado (AM) / Cinamaldeído, carvacrol.	<ul style="list-style-type: none"> • O revestimento foi capaz de liberar quantidades elevadas de agente antimicrobiano (mais do que 90 %), levando a uma atividade antimicrobiana suficiente; • As propriedades antimicrobianas dos papéis revestidos mostraram uma inibição do crescimento de <i>E. coli</i> de 4 a 5 log e um atraso no crescimento de até 21 dias para <i>B. cinerea</i>.

Autor (ano)	Papel / Revestimento / Agente ativo	Resultados mais relevantes
Rodríguez, Nerín, and Batlle (2008)	Papel (40g/m ²) / Parafina / Óleo essencial de canela.	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição antifúngica completa contra <i>Rhizopusstolonifer</i> com 6 % (m/m) do óleo essencial no papel revestido; • Após 3 dias, obteve-se inibição quase completa com 6 % de óleo essencial de canela em pão fatiado; • A migração através do <i>headspace</i> da embalagem parece ser muito mais significativa do que a migração através do contato direto.
Rodríguez- Lafuente, Nerín, and Batlle (2010)	Papel Kraft (100 g/m ²) / Parafina / Óleos essenciais (OE) de casca de canela, folha de canela, cravo e orégano.	<ul style="list-style-type: none"> • OE de casca de canela e OE de orégano apresentaram o melhor desempenho quando incorporados ao papel ativo; • Inibição quase total do fungo foi obtida com 6 % de OE de casca de canela; • O OE de canela é mais recomendado porque requer menor concentração na embalagem para atingir os resultados pretendidos, minimizando assim o risco de alteração sensorial.
Mascheroni et al. (2011)	Papel comercial (70 g/m ²) / Glúten de trigo (GT), argila montmorilonita (MMT) / Carvacrol.	<ul style="list-style-type: none"> • A difusividade do carvacrol aumentou com o aumento de umidade relativa, e a presença de uma quantidade elevada de MMT (≥ 5 % wt) acentuou o efeito; • A eficiência antimicrobiana em relação à <i>Escherichia coli</i> mostrou que o efeito antimicrobiano está diretamente relacionado com a difusividade do carvacrol e com a área em contato com a amostra.
Nassar e Youssef (2012)	Folhas de papelão reciclado (150 g/m ²) / Poliestireno (PS) / Nanopartículas de prata (AgNP).	<ul style="list-style-type: none"> • As folhas de papelão reciclado revestido por nanocompósitos PS/AgNP apresentaram atividade antibacteriana para diferentes estirpes; • As propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor d'água foram melhoradas pelo processo de recobrimento.

Autor (ano)	Papel / Revestimento / Agente ativo	Resultados mais relevantes
Kamel (2012)	Papel Kraft não branqueado (84,1 g/m ²) / Acrilamida / Nanopartículas de prata (AgNP).	<ul style="list-style-type: none"> • O novo biomaterial demonstrou ação biocida contra G+ bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>, G- bactéria <i>P. aeruginosa</i> e a levedura <i>C. albicans</i>; • Viabilidade para ser utilizado como um material de embalagem antibacteriano para alimentos, uma vez que o método não envolve solventes orgânicos.
Rudra et al. (2013)	Papel de embrulho comercial (18,7 g/m ²) / Solução aquosa / Sorbato de potássio (SP), metabissulfito de potássio (MSP) e permanganato de sódio (PMS).	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito inibitório de permanganato de sódio sobre o crescimento de <i>Candida pelliculosa</i> (58 %); • Efeito de enfraquecimento da força física do papel (resistência à tração, percentagem de alongamento, a absorção de energia de tração e rigidez); • A concentração ideal de produtos para a máxima resistência e eficácia antimicrobiana foi de SP 10 %, MSP 493 ppm e PMS 3,33 %.
Liu et al. (2014)	Papel de cópia (70 g/m ²) / Dialdeído carboximetilcelulose (DCMC) / Hidrocloreto de guanidina (HG).	<ul style="list-style-type: none"> • O índice de resistência em seco aumentou de cerca de 20 %, após o papel ser revestido com DCMC-HG. • Excelentes atividades antimicrobianas contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>; • A zona de inibição tornou-se maior à medida que o conteúdo de HG enxertado em DCMC era aumentado;
Wrona, Bentayeb, e Nerin (2015)	Papel filtro / - / Metabissulfito de sódio combinado com ácido cítrico, extrato de chá verde e óleo essencial de canela.	<ul style="list-style-type: none"> • O dióxido de enxofre não estava presente nas amostras após o tempo de armazenamento, cumprindo a legislação europeia; • O extrato de chá verde em concentração elevada manteve a cor branca dos cogumelos por um período mais longo do que as amostras puras; • Óleo essencial de canela não mostrou propriedades antioxidantes suficientes para inibir a deterioração dos cogumelos e/ou aumentar a vida de prateleira.

Autor (ano)	Papel / Revestimento / Agente ativo	Resultados mais relevantes
Akrami et al. (2015)	Papel (70 g/m ²) / Parafina / Óleos essenciais extraídos de <i>Zataria (Zataria multiflora)</i> e dois cultivares de cominho (<i>Cuminum cyminum</i>).	<ul style="list-style-type: none"> • Todas as bactérias estudadas foram inibidas com revestimento com óleo essencial de <i>Zataria</i>; • <i>Zataria</i> mostrou também ter as melhores propriedades antioxidantes; • Os cultivares de cominho apresentaram menores propriedades antioxidantes e não o suficiente para inibir os patógenos comuns estudados.
Liu et al. (2015)	Papel filtro (100 g/m ²) / Celulose nanofibrilada (CNF) / Triclosan (TCS)	<ul style="list-style-type: none"> • O papel revestido exibiu uma excelente atividade antibacteriana contra a <i>Escherichia coli</i>; • A % de inibição do crescimento das bactérias aumentou como o aumento da quantidade de carga do triclosan revestido no papel, chegando a 98,7 %; • Melhora significativa nas propriedades mecânicas do papel revestido.
Lipparelli et al. (2015)	Papel poroso extra branco (80 g/m ²) / - / Óleo de copaíba.	<ul style="list-style-type: none"> • O óleo de copaíba foi eficiente contra bactérias <i>B. subtilis</i>; • A melhor correlação entre propriedades antibacterianas e o cheiro suave foram obtidas com concentração de óleo em torno de 20 % em peso.
Echegoyen e Nerin (2015)	Papel Kraft (100 g/m ²) / Parafina sólida e emulsão / Óleo essencial de canela.	<ul style="list-style-type: none"> • Os papéis ativos foram mais eficientes em evitar a perda de massa e o escurecimento dos cogumelos; • A eficiência aumentou quando o fundo e as paredes das bandejas foram recobertas, em vez de apenas o fundo; • Os melhores resultados foram observados quando a canela foi incorporada na emulsão de parafina, em vez da parafina sólida.

Com base na pesquisa bibliográfica apresentada, observa-se que a aplicação de revestimentos contendo agentes ativos antimicrobianos e antioxidantes em papéis pode favorecer a melhoria das propriedades mecânicas da embalagem, bem como auxiliar no combate a processos de deterioração do alimento, prolongando assim sua vida de prateleira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema de estudo deste trabalho, que dará a fundamentação teórica necessária para nortear o desenvolvimento da embalagem celulósica ativa para aplicação em carne bovina fresca.

2.1 CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Conservar os alimentos para prolongar a sua vida útil associando simultaneamente a segurança e qualidade, é uma das principais preocupações da indústria de alimentos e das agências governamentais. Para a indústria da carne, varejistas e consumidores, a deterioração da carne crua representa uma perda que pode chegar a 40 % de toda produção. Para satisfazer a demanda em estender a vida de prateleira da carne fresca e a redução da deterioração, técnicas de embalagem conservantes atóxicas vêm sendo amplamente pesquisadas (LORENZO; BATLLE; GÓMEZ, 2014).

Tradicionalmente, os métodos de preservação de carne podem ser agrupados em três categorias gerais com base no controle de temperatura, umidade e, mais diretamente, por meio de processos de inibição de microorganismos (bactericida e bacteriostático, tais como a radiação ionizante, a embalagem, etc.), apesar de um determinado método de preservação poder envolver vários princípios antimicrobianos. Se cada um desses processos de controle for aplicado minimamente, pode ser considerado como um "obstáculo" contra a proliferação microbiana, e a combinação deles é chamada tecnologia de obstáculos (HT). Assim condições de operação são concebidas para atingir objetivos específicos em termos de qualidade organoléptica e microbiana (LAWRIE; LEDWARD, 2006).

Além da contaminação microbiológica, a oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração da qualidade da carne durante o processamento, distribuição e refrigeração, reduzindo assim, a estabilidade no armazenamento e a aceitabilidade. A oxidação lipídica produz alterações nos parâmetros de qualidade de carne, tais como propriedades organolépticas e de valor nutritivo, o que leva à geração e acúmulo de compostos que podem representar riscos para a saúde humana (BARBOSA-PEREIRA et al., 2014).

As mais recentes inovações em preservação investigadas para carne fresca são tecnologias de inativação não térmicas, tais como alta pressão hidrostática (HHP), novos sistemas de embalagem, tais como embalagens com atmosfera modificada (MAP), embalagem ativa,

compostos antimicrobianos naturais e biopreservação. Todas estas alternativas buscam tecnologias brandas em relação ao consumo de energia, amigáveis com o meio ambiente e que garantam aspecto natural ao eliminar os microrganismos patogênicos e deteriorantes (ZHOU; XU; LIU, 2010).

Nesse sentido, as novas tecnologias de embalagem de alimentos estão se desenvolvendo como resposta às exigências dos consumidores e às tendências da produção industrial em relação às características dos produtos alimentares de conservação, sabor, prazo de validade prolongado e qualidade controlada (DAINELLI et al., 2008).

2.1.1 Segurança alimentar

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um dos mais frequentes problemas de saúde pública enfrentados no mundo contemporâneo. São causadas por agentes etiológicos, principalmente micro-organismos, os quais penetram no organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados (NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992).

Ao longo da década de 1990 e até hoje, três grandes grupos de bactérias de origem alimentar (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* e *E. coli*) têm persistido, comandando a maioria das pesquisas e vigilância de órgãos governamentais e, em grande parte, maior conscientização da indústria de alimentos. Mais recentemente, tem havido uma crescente preocupação com *L. monocytogenes*. Estes patógenos bacterianos, em conjunto, constituem a maior fonte de doenças de origem alimentar para os quais a etiologia é conhecida. Não é de surpreender, portanto, que estas doenças demandam os maiores interesses da saúde pública e da consciência de decisão política para as doenças infecciosas intestinais. Eles também fornecem exemplos claros da persistência de agentes patogênicos de origem alimentar bacteriana, apesar dos esforços consideráveis que visem à prevenção e controle (NEWELL et al., 2010).

Estima-se que cerca de 76 milhões de casos de doenças de origem alimentar, resultando em 325.000 hospitalizações e 5000 mortes, ocorrem a cada ano apenas nos Estados Unidos da América (EUA) (MEAD et al., 1999). No Brasil, Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, ocorreram mais de 3.400.000 internações por DTA, de 1999 a 2004, com uma média de cerca de 570 mil casos por ano (CARMO et al., 2005 apud WELKER et al., 2010).

As camadas menos favorecidas da população geralmente são as mais afetadas pela contaminação alimentar, devido aos hábitos culturais

da alimentação e à necessidade de optar por produtos com menor preço, geralmente de pior qualidade e mais contaminados. De fato, as regiões Norte e Nordeste do país são as que apresentam as maiores taxas de incidência de casos de DTA internados, comparadas com as outras regiões. De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), de 1999 a 2002, ocorreram 25.281 óbitos por DTA no Brasil, com uma média de 6.320 óbitos por ano (WELKER et al., 2010).

2.2 EMBALAGENS ATIVAS

Tradicionalmente, sabe-se que a principal finalidade das embalagens é proteger e conservar os alimentos contra qualquer tipo de ação de deterioração sejam elas de natureza química, física ou microbiológica, agindo como uma barreira inerte, assegurando a manutenção de suas próprias características, por um período de tempo mais longo, após seu processamento (VERMEIREN et al., 1999).

Porém, a crescente demanda por produtos “prontos-para-comer” e de fácil consumo estão aumentando a necessidade de melhorar o controle sobre qualidade e segurança alimentar. Os surtos de doenças transmitidas por alimentos têm ocasionado a busca de novas formas de inibir o crescimento microbiano em produtos, mantendo assim a sua qualidade, frescor e segurança. Uma nova tendência na tecnologia de conservação de alimentos consiste em utilizar embalagens ativas, a fim de ampliar esta margem de segurança (SANTIAGO-SILVA et al., 2009).

Embalagem ativa é um dos conceitos inovadores em alimentos, introduzido em resposta às contínuas mudanças nas exigências dos consumidores e nas tendências do mercado. Esta tecnologia está fundamentada no processo de incorporação de certos componentes em sistemas de embalagem que liberam ou absorvem substâncias a partir de/ou para os alimentos embalados ou para o ambiente circundante, de modo a prolongar a vida de prateleira e manter a qualidade, segurança e características sensoriais do alimento (REALINI; MARCOS, 2014).

Atualmente, embalagem ativa é uma das tecnologias mais dinâmicas utilizadas para preservar a qualidade, segurança e propriedades sensoriais dos alimentos. A embalagem ativa interage positivamente com o produto e ambiente para melhorar / preservar a qualidade dos alimentos mais do que a embalagem convencional (BARBOSA-PEREIRA et al., 2014).

Alguns sistemas de embalagens ativas já foram desenvolvidos e encontram aplicação em produtos disponíveis no mercado. As principais técnicas em embalagens ativas dizem respeito a substâncias que absorvem

oxigênio, etileno, umidade e odor, e aquelas que emitem dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas (REALINI; MARCOS, 2014).

Na Tabela 2 são apresentados alguns tipos de embalagens ativas comerciais para produtos alimentícios, seus respectivos fornecedores e o sistema que é empregado na aplicação da embalagem ativa.

Tabela 2 – Tipos de embalagens ativas com uso comercial para alimentos.

Nome comercial	Fornecedor	Sistema de aplicação
<i>Absorvedores de umidade</i>		
Dri-Loc®	Sealed Air Corporation	Bandeja absorvente
Linpac	Linpac Packaging Ltd.	Bandeja absorvente
TenderPac®	SEALPAC	Sistema de compartimento duplo
Nor® Absorbit	Nordenia International	Filme para microondas
<i>Embalagem antimicrobiana</i>		
Irgaguard®	BASF	Masterbatch à base de prata
Sanic Films	Nanopack	Interfoliadores
Food-touch®	Microbeguard Corp.	Interfoliadores
Negamold	Nippon Kayalan	Sachês
Oiteck		
Aglon™	Agion Technologies	Papel, embalagens de plástico
SANICO®	Laboratories STANDA	Revestimento antifúngico
<i>Emissores de dióxido de carbono</i>		
CO ₂ ® Fresh Pads	CO ₂ Technologies	Bandeja emissora de CO ₂
SUPERFRESH	Vartdal Plastindustri	Sistema emissor de CO ₂
Verifrais	SARL Codimer	Sachês
<i>Eliminadores de oxigênio</i>		
OxyGuard®	Clariant Ltd.	Sachês
Ageless®	Mitsubishi G. C. Inc.	Etiqueta
Enzyme-based	Bioka Ltd.	Filme
<i>Antioxidantes</i>		
ATOX	Artibal SA	Revestimento de filme
<i>Outros</i>		
FreshCase®	Bemis Company Inc.	Filme contendo nitrito de sódio
Sira-Crisp®	Sirane Ltd.	Suscetível a microondas
MicVac®	SEALPAC GmbH	Válvula de vapor

Fonte: adaptado de Realini e Marcos (2014) e Coma (2008).

Se comparado com o Japão, EUA ou a Austrália, a penetração de embalagens ativas no mercado europeu é limitada até o momento. Tendo-se atribuído este atraso em comparação com o Japão, EUA e Austrália, principalmente, a uma legislação europeia inadequada e não flexível o suficiente para conseguir acompanhar as inovações tecnológicas no setor

de embalagem de alimentos. (DAINELLI et al., 2008). No Brasil, o desenvolvimento envolvendo embalagens ativas ainda encontra-se em nível laboratorial (SOARES et al., 2009).

2.2.1 Embalagens ativas antimicrobianas

A embalagem antimicrobiana é um tipo de embalagem ativa que apresenta uma substância antimicrobiana incorporada e/ou imobilizada em um material de embalagem e é capaz de eliminar ou inibir microrganismos deterioradores e, ou patogênicos. O princípio básico de atuação dessa embalagem é a adição de uma barreira adicional (microbiológica) além das barreiras físicas (oxigênio e umidade) (HAN, 2003).

Para Cooksey (2005), o conceito fundamental das embalagens antimicrobianas é de melhorar as medidas de segurança e qualidade já utilizados pela indústria de alimentos. Ela não se destina como substituto para boas práticas de fabricação e manuseio, mas sim, para servir como um obstáculo adicional a impedir o crescimento microbiano.

O desenvolvimento da embalagem antimicrobiana apresenta-se como uma abordagem promissora para controlar ativamente o crescimento de micro-organismos presentes nos alimentos embalados. A proliferação microbiana acelera as alterações no aroma, cor e textura dos alimentos, resultando na redução da vida-de-prateleira e aumentando o risco de doenças transmitidas pelos produtos. Assim, embalagens antimicrobianas têm a função de aumentar a fase de latência (*lag*) e reduzir a fase de crescimento de micro-organismos, a fim de prolongar a vida útil e manter a qualidade e segurança dos alimentos (KERRY, 2014).

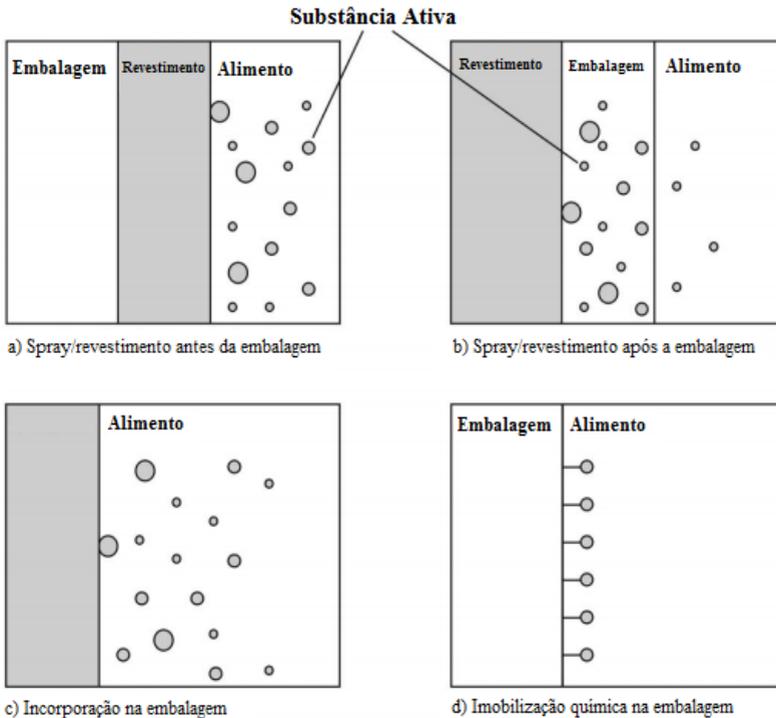
Segundo Appendini e Hotchkiss (2002), as embalagens antimicrobianas podem assumir várias formas, incluindo: i) a adição de saquetas/pastilhas contendo agentes antimicrobianos voláteis em pacotes; ii) incorporação de agentes antimicrobianos voláteis e não voláteis diretamente em polímeros; iii) revestimento ou adsorção de agentes antimicrobianos em superfícies poliméricas; iv) a imobilização dos agentes antimicrobianos em polímeros através de ligações covalentes ou iônicas, e; v) a utilização de polímeros que são inerentemente antimicrobianos.

O uso de embalagens contendo agentes antimicrobianos tem como vantagem a difusão desses compostos da embalagem para a superfície do alimento de maneira controlada. Quando o antimicrobiano é liberado da embalagem ao longo do tempo, a cinética de crescimento microbiano e a atividade antimicrobiana na superfície do produto podem ser

equilibradas. Dessa forma, a atividade antimicrobiana da embalagem pode ser estendida, garantindo a segurança durante a distribuição dos alimentos (SOARES et al., 2009).

A Figura 1 mostra os possíveis fenômenos de transferência de massa envolvidos de uma substância ativa que foi incorporada em uma película, um revestimento, ou diretamente na matriz polimérica da embalagem, com diferentes aplicações no alimento.

Figura 1 – Transferência de massa da substância ativa nas diferentes aplicações de sistemas de embalagens antimicrobianas.



Fonte: Adaptado de Quintavalla e Vicini (2002).

Na Figura 1 (a), a adição do agente antimicrobiano por recobrimento ou na forma de spray é feita antes da embalagem, que é o caso dos filmes comestíveis aplicados diretamente sobre o alimento. Além do benefício devido ao fato de ser comestível e biodegradável, tem simples manuseio, podendo ser aplicada a seco ou com cobertura úmida (HAN, 2003). Oussalah et al (2004) avaliaram a capacidade de um filme

comestível à base de proteína de leite contendo 1 % de óleos essenciais de orégano, pimentão, ou ambos, aplicados em fatias de músculo da carne, e mostraram a eficiência dos filmes com atividade antimicrobiana e antioxidante no alimento testado.

Quando o agente antimicrobiano for aplicado por recobrimento ou na forma de spray após o produto já estar embalado, tem-se a representação da migração do aditivo conforme mostrado na Figura 1 (b). Os agentes antimicrobianos que não podem tolerar as temperaturas utilizadas no processamento de polímeros são frequentemente revestidos sobre o material depois da embalagem ou são adicionados para moldar filmes. Para antimicrobianos sensíveis ao calor, como enzimas e compostos voláteis, mistura com solvente podem ser um método mais adequado para a sua incorporação em polímeros. A lisozima, por exemplo, tem sido incorporada em películas de éster de celulose por meio de solvente, a fim de evitar a desnaturação térmica da enzima (HOTCHKISS, 1997).

Na Figura 1 (c), a incorporação do agente antimicrobiano é feita diretamente na matriz do polímero, tais como polietileno, polipropileno, poli(butadieno-estireno). Neste caso, o aditivo a ser utilizado deve ser resistente às mesmas condições processuais do polímero em questão, o qual, em geral, é submetido a condições de temperatura de extrusão do mesmo. Para a eficiência e posterior atuação antimicrobiana, faz-se necessário um estudo da estabilidade do aditivo frente às condições de processo (FRONZA, 2009). Barbosa-Pereira et al. (2014), desenvolveram filmes de poli(etileno-acetato de vinila) (EVA) e polietileno de baixa densidade (PEBD) via extrusão, incorporados com extratos naturais fenólicos e nanoargilas funcionalizadas. Os autores observaram que os filmes com maiores concentrações de extratos ou nanoargilas funcionalizadas proporcionaram os melhores resultados, retardando tanto a oxidação da carne em cerca de 60 % quanto o crescimento de *S. aureus*.

A Figura 1 (d), mostra a imobilização química do agente antimicrobiano, que utiliza de ligação iônica ou covalente do agente antimicrobiano com uma estrutura do material de embalagem, quando a legislação não permite a migração destes agentes no alimento, devendo a inibição acontecer apenas na interface embalagem-alimento (HAN, 2005). Este tipo de imobilização requer a presença de grupos funcionais em ambas as partes, antimicrobiana e o polímero. Exemplos de agentes antimicrobianos com grupos funcionais são os peptídeos, enzimas, poliaminas e ácidos orgânicos. Exemplos de polímeros utilizados para a embalagem de alimentos que possuem grupos funcionais são: Polietileno

(PE) copolímero, nylon, poli(cloreto de vinila) (PVC) copolímero e poliestireno (PS) (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

2.2.1 Embalagens ativas antioxidantes

Os processos oxidativos são um dos principais mecanismos de deterioração da qualidade em carnes e produtos derivados. Levam à degradação de lipídios, proteínas e pigmentos, causando perda de sabor, cor, valor nutritivo, e ainda limitam a vida de prateleira destes produtos (LIU et al., 2010).

Diferentes antioxidantes têm sido usados com sucesso para inibir a oxidação em alimentos cárneos. No entanto, a incorporação de antioxidantes em formulações de alimentos pode afetar os parâmetros de qualidade alimentar, tal como a cor ou o sabor e há uma preferência do consumidor por exclusão de aditivos em alimentos (MITSUMOTO et al., 2005).

Uma alternativa que vem se destacando para preservar alimentos sensíveis à oxidação é a utilização de embalagens ativas antioxidantes (LEE, 2005). Esta tecnologia consiste na incorporação de substâncias antioxidantes em filmes plásticos, papéis ou sachês, de onde serão liberadas para proteger os alimentos da degradação oxidativa, inibindo as reações de oxidação ao reagirem com radicais livres e peróxidos e, conseqüentemente, estendendo a sua vida de prateleira (VERMEIREN et al., 1999; BRODY, STRUPINSKY e KLINE, 2001; LEE et al., 2004).

Muitas pesquisas nos últimos anos têm-se concentrado no desenvolvimento de embalagens ativas que contêm antioxidantes naturais. Assim, alguns autores têm incorporado substâncias antioxidantes em embalagens, avaliando como estas podem migrar e retardar o processo oxidativo dos alimentos durante o armazenamento (BARBOSA-PEREIRA et al., 2014). Moore et al. (2003) concluíram que a incorporação de substâncias antioxidantes (tais como BHT, BHA, alfatocoferol e extrato de alecrim) em embalagens pode ser mais eficaz do que a utilização direta de aditivos sobre a superfície da carne.

Alguns sistemas de embalagens ativas têm sido desenvolvidos usando extratos naturais, como alecrim, orégano e chá verde que são duofuncionais, ou seja, possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, para aumentar a estabilidade de diferentes produtos de carne e, assim, aumentar a sua vida de prateleira (NERÍN et al., 2006; CAMO et al., 2011; CALATAYUD et al., 2013)

2.2.1.1 Agentes ativos

Vários compostos naturais e sintéticos têm tido seu potencial antimicrobiano analisado dentro do conceito das embalagens ativas, a exemplo de íons metálicos, ácidos orgânicos, bacteriocinas e fungicidas, como os benzoatos e sorbatos (MORAES et al., 2007).

A Tabela 3 apresenta exemplos de substâncias ativas com atividade antimicrobiana, incorporadas em diferentes matrizes poliméricas e os microrganismos alvos.

Tabela 3 – Substâncias ativas com atividade antimicrobiana, *versus* microrganismo alvo/suporte polimérico.

Antimicrobiano	Suporte Polimérico	Microrganismo
<i>Ácidos orgânicos/anidridos:</i> Propiônico, benzóico, sorbico, acético, láctico e málico	Flmes comestíveis, EVA, PELBD	Bolores
<i>Gases inorgânicos:</i> SO ₂ , dióxido de cloro	Várias poliolefinas	Bolores, bactérias, fungos
<i>Metais:</i> Prata	Várias poliolefinas	Bactérias
<i>Fungicida:</i> benomil, imazil	PEBD	Fungos
<i>Bacteriocinas:</i> nisina, pediocinas, lactocinas	Filmes comestíveis, celulose, PEBD	Bactérias Gram-positivas
<i>Enzimas:</i> Lizosima, glucose-oxidase	Acetato de celulose, poliestireno, filmes comestíveis	Bactérias Gram-positivas
<i>Agentes quelantes:</i> EDTA	Filmes comestíveis	Bactérias Gram-negativas
<i>Especiarias:</i> canela, cafeína, raiz forte (alisiotiocinato)	Nylon/PE, celulose	Fungos, bolores, bactérias
<i>Extrato de plantas:</i> óleo de sementes de uva, bambu-seco	PEBD, celulose	Fungos, bolores, bactérias
<i>Parabenos:</i> propilparabeno, etilparabeno	Clay-cout, celulose e PEBD	Fungos
<i>Combinações:</i> Hexametil- etramina	PEBD	Bolores, anaeróbios e aeróbios

Fonte: adaptado de Appendini e Hotchkiss (2002).

Ademais da ação microbiológica, a oxidação constitui um dos mecanismos mais frequentes de deterioração e redução da vida útil dos alimentos. Além de alterar o gosto e a qualidade nutritiva (perda de vitaminas e ácidos graxos essenciais) dos alimentos, a oxidação resulta

em compostos reativos e tóxicos que representam um perigo para os consumidores (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007).

A incorporação de substâncias antioxidantes em filmes plásticos, papéis ou sachês, de onde serão liberadas visam proteger os alimentos da degradação oxidativa, inibindo as reações de oxidação ao reagirem com radicais livres e peróxidos e, conseqüentemente, estendendo a sua vida de prateleira (VERMEIREN et al., 1999).

Na Tabela 4 são apresentados alguns exemplos de substâncias ativas antioxidantes incorporadas em embalagens ativas para alimentos.

Tabela 4 – Aditivos antioxidantes empregados em embalagens ativas.

Matriz polimérica	Substância antioxidante	Matriz de alimento ou meio simulante
Gelatina de pele de peixe	Óleo essencial de erva-cidreira (LEO)	Fatias pescado (<i>Lates calcarifer</i>)
PP (polipropileno)	Ácido cafeico	Suco de laranja
PET poli(tereftalato de etila)	Extrato cítrico (α -tocoferol)	Carne de peru cozido
Proteína do leite	Óleos essenciais: orégano, pimento Extrato de chá verde e óleos essenciais: cravo, canela, tomilho, gengibre	Carne bovina
Celulose	Carvacrol	Óleo de soja
PEAD (polietileno de alta densidade)	Nisina, α -tocoferol	Azeite de oliva, água destilada
Copolímero de etileno vinil acetato		Emulsão creme de leite modelo (66 % água, 32 % parafina com 2 % de emulsificante)

Fonte: adaptado de Sanches-Silva et al. (2012).

A escolha do agente ideal deve considerar: tipo de alimento, método de processamento, armazenamento, micro-organismo envolvido, níveis tóxicos (JAY, 1992), a legislação sobre a lista positiva de aditivos para materiais poliméricos em contato com alimento (BRASIL, 2008) e, ainda, a lista positiva de aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2010a).

2.2.1.1.1 Ácido cítrico

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial IUPAC ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico e fórmula molecular

$C_3H_5O(COOH)_3$, é um ácido orgânico fraco que pode ser encontrado nos citrinos. É um ácido orgânico tricarbóxico presente na maioria das frutas, sobretudo em cítricos como o limão e a laranja (COSTA, 2011). As principais propriedades físico-químicas do ácido cítrico estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas do ácido cítrico anidro.

Propriedades	
Fórmula molecular	$C_3H_5O(COOH)_3$
Massa molar	192,123 g/mol
Aparência	Sólido branco e cristalino
Ponto de fusão	153 °C
Densidade	1,665 g/cm ³
Solubilidade em água	133 g/100 mL (20 °C)
Ponto de ebulição	Decompõe-se a 175 °C

Fonte: adaptado de Labsynth (2013).

Atualmente, o ácido cítrico é quase que exclusivamente produzido industrialmente por meio de processos de biossíntese, utilizando como agente biológico o fungo *Aspergillus niger*. Dois processos são utilizados na biossíntese de ácido, o de superfície e o submerso, que se diferenciam essencialmente pelo modo de crescimento do micro-organismo. Os processos fermentativos são responsáveis por mais de 90 % da produção de ácido cítrico, uma vez que são mais econômicos e simples do que a rota química (SANTOS, 2005).

O ácido cítrico é um acidulante versátil, tendo como características alta solubilidade, ação sequestrante de íons metálicos, o que previne reações indesejáveis de oxidação, formação de cor e aromas em produtos alimentícios. A acidez do ácido cítrico é devida a presença dos três grupos carboxilas-COOH que podem perder um próton em solução, formando como consequência um íon citrato. Os citratos são bons controladores de pH de soluções ácidas e auxiliam na preservação e condimentação de alimentos (THERON; LUES, 2010).

No Sistema Internacional de Numeração (*Internacional Numbering System*), o ácido cítrico está registrado como acidulante INS 330. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 45, que dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o ácido cítrico encontra-se cadastrado com classe funcional ACI/ACREG/ANT/SEC (acidulante, agregador de sabor, antioxidante e agente sequestrante), sem um limite definido de uso. Esta legislação autoriza o uso de ácido cítrico em diferentes alimentos,

com limite *quantum satis* (q.s.), ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado (BRASIL, 2010a).

Além disso, o ácido cítrico é considerado “GRAS” (*Generally Recognized as Safe*, ou, geralmente reconhecido como seguro) pela *United States Food and Drug Administration* e aditivo alimentício seguro pelo “*FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*”, sem restrições à quantidade usada (CARGILL, 2000).

Estudos recentes têm mostrado o potencial antioxidante e antimicrobiano associado ao ácido cítrico na conservação de produtos cárneos. Vargas Júnior et al. (2015) avaliaram os efeitos antioxidantes / antimicrobianos de embalagens ativas para a carne produzida a partir de amido de milho, polietileno de baixa densidade linear (PEBDL) e ácido cítrico. Os autores verificaram que as amostras de carne embaladas com os filmes ativos e armazenadas sob refrigeração mostram uma redução significativa dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e uma diminuição de cerca de 1 log na contagem bacteriana total na carne, quando comparadas com as amostras embaladas no filme de controle (não ativo). A cor também foi melhorada, com um aumento no parâmetro a^* (vermelhidão) que caracteriza a cor vermelha da carne desejável.

González-Fandos, Herrera, e Maya (2009) avaliaram o efeito do ácido cítrico no crescimento bacteriano de *Listeria monocytogenes* em coxas de aves armazenadas a 4 °C por 8 dias. O tratamento com 0,156 M de ácido cítrico durante 5 min mostrou um efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) no crescimento de *L. monocytogenes* em comparação com o controle (sem tratamento), sendo cerca de 1,55 unidades log menor nas coxas tratadas do que no controle, após um dia de armazenamento.

Ainda, Schwan, Dias, e Luiza (2011) testaram o efeito inibidor de diferentes concentrações de ácido cítrico e de outros ácidos orgânicos em *E. coli* isoladas a partir de salsichas de carne de porco. Os autores constaram em experimentos *in vitro* de difusão em disco de ágar e MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) que a concentração mínima de 1,29 M de ácido cítrico já é suficiente para inibir o crescimento bacteriano. Quando adicionado diretamente em salsichas de porco com *E. coli*, o ácido cítrico causou uma redução significativa na contagem desta bactéria.

Apesar de estudos que comprovam as múltiplas atividades do ácido cítrico ainda existem poucos trabalhos relacionados ao uso deste aditivo, considerado seguro do ponto de vista toxicológico, quando incorporado diretamente a filmes biodegradáveis com finalidade de

prevenir o crescimento microbiano superficial, processos oxidativos e a conservação de produtos alimentícios (VARGAS JÚNIOR, 2014).

2.3 EMBALAGENS CELULÓSICAS E SUSTENTABILIDADE

Materiais sintéticos descartáveis, tais como filmes e embalagens derivados de fontes petroquímicas, são amplamente usados na vida cotidiana. Eles criam uma grande quantidade de resíduos não biodegradáveis, o que provoca problemas ambientais globais. Além disso, o declínio dos recursos de petróleo faz com que esses materiais sejam ainda mais indesejáveis. Para substituir as embalagens sintéticas descartáveis à base de petróleo com alternativas mais sustentáveis, materiais naturais e seus derivados têm chamado atenção significativa nos últimos anos (SIRVIÓ et al., 2013).

Vários materiais recicláveis vêm sendo pesquisados e estudados, mas poucos estão sendo comercializados. As embalagens recicláveis mais utilizadas são as obtidas a partir da celulose, incluindo papel, papelão e cartões (GÄLLSTEDT; HEDENQVIST, 2006).

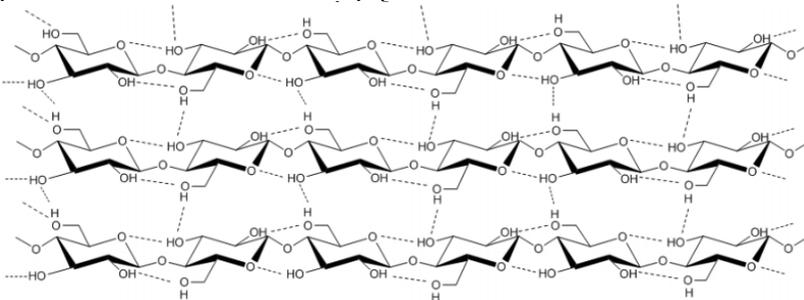
A indústria de embalagens celulósicas, derivada do setor de produtos florestais, tem como matéria-prima básica a madeira, material renovável com alta capacidade de regeneração (HISCHIER; ALTHAUS; WERNER, 2005). A capacidade de regeneração da madeira nas escalas de tempo é característica única quando comparada a outros materiais (MOURAD; GARCIA; VILHENA, 2002).

2.3.1 Papel

O papel consiste em uma matriz de fibras de celulose interligadas por ligações de hidrogênio entre grupos hidroxilas nas fibras adjacentes. O tamanho e espessura das fibras variam em função da matéria-prima, do processo de polpeamento e do objetivo da aplicação. A matriz celulósica apresenta porosidade, geralmente reduzida pela incorporação de minerais (JOHNSTON; MORAES; BORRMANN, 2005).

A Figura 2 mostra a disposição da rede de ligações de hidrogênio presentes nas fibras de celulose em folhas de papel.

Figura 2 – Representação esquemática da rede de ligações de hidrogênio presentes nas fibras de celulose do papel.



Fonte: Xi, Du e Zhong (2013).

Em virtude da elevada higroscopicidade, o papel absorve umidade do ambiente, podendo causar perda das propriedades mecânicas originais. Para minimizar este problema, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas com foco na impregnação de materiais não-higroscópicos e biodegradáveis (NARAYAN; BLOEMBERGEN; LATHIA, 1999). O desenvolvimento de materiais compostos, papel-biopolímero, pode combinar suas propriedades distintas melhorando a sua performance (JOHNSTON; MORAES; BORRMANN, 2005).

2.3.2 Revestimento do papel

Papel e derivados à base de celulose são materiais de embalagem “verde”, devido à sua capacidade de renovação, reciclagem e biodegradabilidade. No entanto, antes da aplicação industrial na embalagem, o papel geralmente precisa ser revestido com outros materiais como o polietileno, poli(tereftalato de etila), poli(tereftalato de butila), etc., para melhorar as suas propriedades de barreira contra água ou vapor d’água. Estes polímeros derivados fósseis são difíceis para qualquer recuperação ou degradação. Assim, hoje em dia eles estão sendo gradualmente substituídos por materiais biopoliméricos na indústria de fabricação de papel para revestimento de superfícies (ZHANG; XIAO; QIAN, 2014).

Materiais biopoliméricos originados a partir de recursos renováveis, naturalmente, tais como polissacarídeos, proteínas e lípidios, ou combinações de tais componentes, têm o potencial para substituir os revestimentos de papel sintéticos atuais, uma vez que oferecem vantagens ambientais favoráveis de reciclagem e reutilização. Derivados de resíduos

agroindustriais como alternativa para materiais de embalagem de poliolefinas reduzem a importação e exploração de petróleo e seus derivados e proporcionam uma oportunidade para fortalecer a economia agrícola. Além disso, polímeros biodegradáveis desenvolvidos para materiais de embalagem têm propriedades de aplicação adequadas e podem ser descartados após o uso de uma forma economicamente e ecologicamente aceitável (ALOUÍ et al., 2011).

Gastaldi et al. (2007) utilizou as proteínas glúten de trigo, caseinato de cálcio e farelo de glúten de milho, como matéria-prima para preparar soluções de revestimento para papel. Como esperado, as espessuras do papel revestido aumentaram com um aumento de peso de revestimento. Os autores observaram ainda que a microestrutura dos papéis revestidos apresentou diferenças na estrutura e morfologia entre as três matérias-primas, sendo que para otimizar um processo de revestimento, tanto a viscosidade como a afinidade da proteína com papel devem ser levadas em consideração.

Rhim, Lee, e Hong (2006) estudaram o efeito do revestimento dos biopolímeros alginato isolado e proteína de soja nas propriedades mecânicas e barreira de água em papel ondulado. Os revestimentos aumentaram a espessura do papel e resultaram em uma superfície mais lisa e mais homogênea. Embora a resistência à tração tenha diminuído a força de esmagamento não foi diminuída. As propriedades molhantes, tais como o ângulo de contato da gota de água, permeabilidade ao vapor de água (PVA), e capacidade de absorção de água também foram afetadas pelo revestimento biopolímero, mas o grau de alteração foi dependente dos materiais de revestimento, bem como métodos de tratamento. De forma geral, os papéis revestidos com proteína de soja foram mais resistentes à água do que os revestidos com alginato.

Um revestimento com o biopolímero quitosana foi objeto de estudo de Kjellgren et al. (2006). Papel impermeável a gorduras foi revestido tanto em escala laboratorial como em escala piloto para estudar as condições necessárias para se obter um material de embalagem com boas propriedades mecânicas e de barreira ao oxigênio, nitrogênio, dióxido de carbono e ar. Os resultados mais satisfatórios mostraram uma permeabilidade ao oxigênio da mesma gama que a de poli(tereftalato de etileno). A resistência à ruptura não foi afetada pelo peso do revestimento, enquanto que a deformação na ruptura foi mais elevada para gramaturas de revestimento superior a 5 g/m².

2.3.2.1 Gelatina e a enzima Transglutaminase

A gelatina é uma macromolécula hidrocoloidal produzida pela hidrólise parcial do colágeno, que é extraído de peles, ossos e tecidos conjuntivos de animais. Durante o processo de fabricação, a matéria-prima dos animais é tratada com um ácido diluído ou álcali, resultando na clivagem parcial das ligações cruzadas, formando assim uma estrutura que é solúvel em água levemente aquecida, ou seja, a gelatina. (KARIM; BHAT, 2009).

Dentre os biomateriais utilizados para preparação de filmes e revestimentos comestíveis, a gelatina tem sido amplamente utilizada devido a seu espectro de características funcionais, tais como excelentes propriedades de formação de película, elevada capacidade de ligação com a água e propriedades emulsionantes. Além disso, suas vantagens incluem baixo custo, alta disponibilidade e capacidades de biocompatibilidade e biodegradabilidade (WANG et al., 2015).

Devido a seu caráter hidrofílico, os filmes e revestimentos a base de gelatina apresentam alta permeabilidade ao vapor d'água e a resistência mecânica das películas de gelatina diminuem quando em contato com a superfície de produtos com elevado teor de umidade, o que restringe sua aplicação como embalagens (WENG; ZHENG, 2015).

Contudo, tem sido relatado que as propriedades físicas dos filmes de proteína podem ser melhoradas através da reticulação (ou *crosslinking*) sob a ação da enzima transglutaminase, que é considerada como um agente de ligação cruzada seguro e eficaz (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A transglutaminase catalisa a reação de transferência de grupos acil que ocorre entre resíduos de glutamina como "doador de acil" e resíduos de lisina como "receptor de acil". Esta reação resulta na formação de ligações intra e intermoleculares nas proteínas (NORZIAH et al., 2009).

A transglutaminase tem sido aplicada para o *crosslinking* de diversas proteínas e seus complexos, tais como gelatina de peixe, proteína isolada de soja, isolado proteico de soro de leite-gelatina e caseína-gelatina, melhorando as propriedades funcionais dos materiais (WANG et al., 2015; WENG; ZHENG, 2015).

2.4 MICROBIOLOGIA DA CARNE

A carne apresenta uma composição química que a torna um excelente meio de cultura para micro-organismos. Apresenta alta atividade de água, é um alimento rico em substâncias nitrogenadas,

minerais e fatores de crescimento. Além disso, o pH é favorável para o crescimento da maioria dos micro-organismos deteriorantes e patogênicos. A incidência de muitos micro-organismos encontrados na carne fresca é variada, principalmente porque a microbiota inicial da carne é profundamente afetada pelas condições de pré-abate, bem como pelas fontes de contaminação, incluindo facas, mesas de corte, couro e material gastrointestinal (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os micro-organismos encontrados na carne *in natura* se originam de várias fontes. Tipicamente, a maioria da microbiota é composta de micro-organismos encontrados na superfície e/ou no interior do animal. Contudo, as condições ambientais, as operações de processamento, a manipulação e os procedimentos de limpeza e sanificação das instalações têm uma grande influência sobre os tipos e quantidade de micro-organismos encontrados na carne (NOLLET et al., 2012).

2.4.1 Micro-organismos deteriorantes em carnes

A deterioração está relacionada, sobretudo, a micro-organismos advindos de contaminação industrial, durante o abate e processamento, e às condições favoráveis para o crescimento destes micro-organismos, como temperatura durante o transporte, armazenamento e atmosfera da embalagem (NYCHAS et al., 2008).

Como a carne geralmente é mantida em ambientes refrigerados, a microbiota de superfície será dominada por organismos capazes de crescer em temperaturas de refrigeração (2 a 5°C), os chamados micro-organismos psicrotróficos. Dentre estes presentes nesta microbiota de contaminação, aponta-se uma associação de *Pseudomonas-Acinetobacter-Moraxella*, bactérias aeróbias restritas. No gênero *Pseudomonas*, prevalece a *Pseudomonas fragi*, considerada como micro-organismo típico da carne (LAWRIE, 2005).

Com relação à deterioração de carnes frescas por fungos, especialmente a bovina, os seguintes gêneros de bolores têm sido encontrados em vários níveis de deterioração: *Thamnidium*, *Mucor* e *Rhizopus*, todos produtores de hifas na carne; *Cladosporium*, que é a causa comum de “manchas negras”; *Penicillium*, que produz “manchas verdes” e *Sporotrichum* e *Chrysosporium*, que produzem “manchas brancas”. Os bolores aparentemente não crescem em carnes estocadas abaixo de -5°C. Entre os gêneros de leveduras encontrados regularmente em carnes refrigeradas em decomposição estão a *Candida* e a *Rhodotorula*, sendo as duas espécies mais abundantes presentes em carnes bovinas moidas a *C. lipolytica* e a *C. zeylanoides* (JAY, 2005).

2.4.2 Micro-organismos patogênicos em carnes

O ambiente industrial e seus equipamentos podem permitir a sobrevivência de micro-organismos patogênicos, constituindo fontes importantes de contaminação da carne. Biofilmes que alojam patógenos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Yersinia enterocolitica*, podem desenvolver-se rapidamente sobre os equipamentos, podendo atuar como foco de contaminação nas plantas de processamento de carnes, especialmente naquelas com alto grau de automação (LAWRIE, 2005).

Dentre os micro-organismos patogênicos que podem ser encontrados e transmitidos pela carne, figuram *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* e *Bacillus cereus* (SOFOS, 2013).

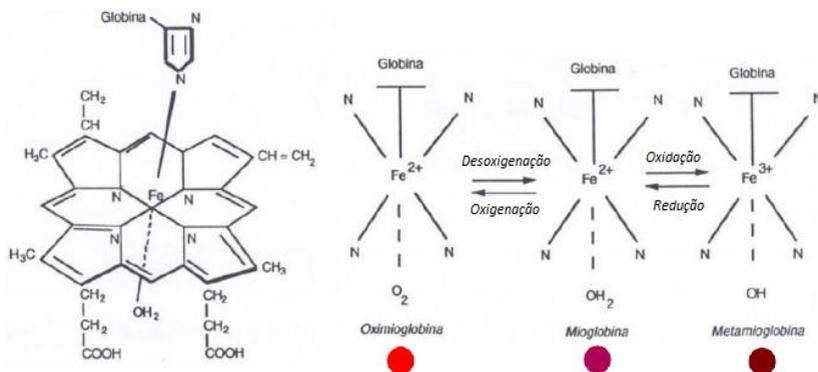
2.5 PROCESSOS OXIDATIVOS EM CARNES

Tipicamente, os processos oxidativos levam à degradação de lipídios e proteínas (incluindo os pigmentos) e são um dos principais mecanismos de deterioração da qualidade em carnes e produtos derivados. Eles causam perda de sabor, cor, valor nutritivo e limitam a vida de prateleira de carnes e produtos derivados (LIU et al., 2010).

Vários fatores afetam as decisões dos consumidores para comprar carne, mas provavelmente o mais importante é a percepção de qualidade. A cor vermelha brilhante para a carne é percebida pelos consumidores como sendo indicativo de frescura, salubridade, e boa qualidade alimentar (CAMO et al., 2011). A cor da carne depende de vários fatores individuais e as suas interações, sendo representada pela estabilidade química do pigmento da carne, a mioglobina, conforme apresentado na Figura 3.

A perda da coloração vermelha superficial da carne depende em grande parte pela taxa de oxidação da oximioglobina para metamioglobina, que confere à carne uma cor castanho pouco atraente ao consumidor (NERÍN et al., 2006).

Figura 3 – Transformações mais comuns no pigmento da carne.



Fonte: adaptado de Uceda (2010).

A formação de metamioglobina a partir da oximioglobina é causada pela oxidação do átomo ferro do seu estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}) (MOORE et al., 2003). Além disso, esta reação geralmente ocorre em paralelo a de rancificação causado por degradação (por hidrólise, oxidação ou ambas) da gordura (NERÍN et al., 2006).

Estudos tem demonstrado que a oxidação lipídica em carne pode causar oxidação do oximioglobina e que antioxidantes solúveis em lipídios poderiam desta forma estabilizar a cor por este mecanismo, inibindo a formação da metamioglobina (GORELIK; KANNER, 2001).

2.6 LEGISLAÇÃO PARA CARNE MOÍDA

Na Instrução Normativa nº 83 de 21/11/03 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, fica estabelecido as regulamentações de caráter técnico de identidade e qualidade de carne moída bovina. Esta normativa destina-se a estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que o produto, chamado de carne moída, deve obedecer. Vale ressaltar ainda que este regulamento se refere à carne moída destinada ao comércio nacional e/ou internacional (BRASIL, 2003).

Conforme preconiza o regulamento, a carne moída é obtida a partir da moagem da massa muscular de carne oriunda de carcaças de bovinos, seguido de resfriamento ou congelamento imediato. Quanto a composição, a legislação traz as seguintes premissas: a carne moída deve ser composta de carnes obtidas de massas musculares esqueléticas de bovinos, podendo apresentar como ingredientes opcional água, com

limite máximo de 3,0 %, teor máximo de gordura de 15,0 %, e ainda deverá apresentar textura, cor, sabor e odor característicos (BRASIL, 2003).

Para a moagem, fica claro na instrução normativa que a carne a ser utilizada como matéria-prima deve estar isenta de tecidos inferiores como ossos, cartilagens gordura parcial, aponevroses, tendões, coágulos, nodos linfáticos, etc. O processo de moagem deverá ser feito em local próprio, a uma temperatura não superior a 10 °C, sendo que a carne não poderá sair do equipamento de moagem a uma temperatura superior a 7 °C. Após a moagem, a carne deve ser submetida imediatamente ao resfriamento ou congelamento (BRASIL, 2003).

Para comercialização, o produto deverá ser embalado com materiais adequados para as devidas condições de armazenamento e transporte, de modo a conferir proteção apropriada. Com relação às temperaturas de armazenamento, a carne moída resfriada deve ser mantida a uma temperatura na faixa de 0 °C a 4 °C, já a carne moída congelada precisa ser acondicionada à temperatura máxima de -18 °C (BRASIL, 2003).

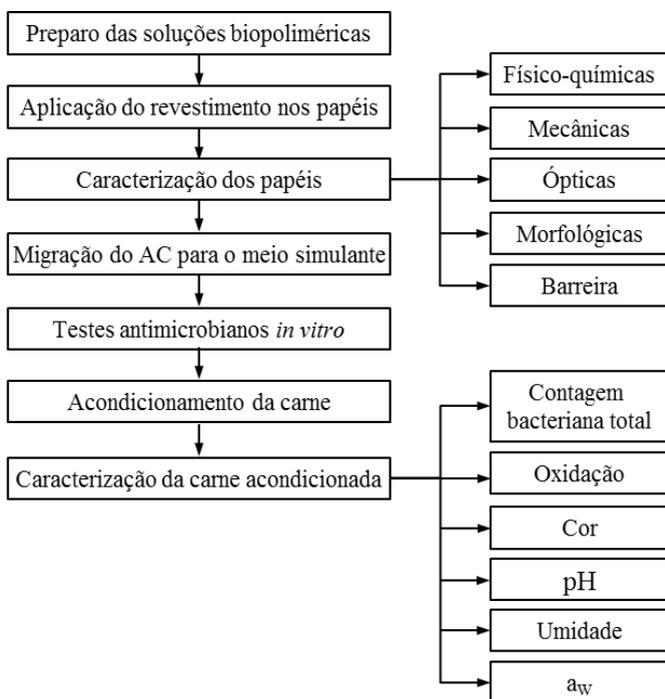
Ainda pela legislação vigente, segundo a RDC nº 12 de 2001, as carnes moídas *in natura* estão aptas para consumo quando houver ausência de *Salmonella sp.* em 25 g (BRASIL, 2001). Os indicadores de qualidade, entretanto, também podem ser pesquisados, como é o caso de coliformes totais e termotolerantes, dentre outros (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados os aspectos do planejamento dos experimentos para elaboração da embalagem celulósica revestida com a solução biopolimérica ativa, assim como os métodos analíticos para caracterização do papel ativo obtido e da avaliação da eficácia na vida de prateleira da carne embalada.

Na Figura 4 pode ser observado um esquema dos procedimentos experimentais e análises realizados para obtenção dos papéis revestidos com ação multifuncional antioxidante e antimicrobiana, que foram aplicados neste trabalho.

Figura 4 – Fluxograma do procedimento experimental realizado.



Inicialmente foram preparadas soluções biopoliméricas puras e contendo diferentes concentrações de ácido cítrico, e estas foram aplicadas como revestimento sobre os papéis, os quais foram submetidos a ensaios para avaliação das propriedades físico-químicas, mecânicas,

morfológicas, ópticas e de barreira. Os papéis também foram avaliados quanto ao teste de migração do agente ativo (ácido cítrico) para o meio simulante (água), e testados quanto à capacidade antimicrobiana *in vitro* para três espécies Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocitogenes*; e três espécies Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*.

Para a avaliação da eficiência no aumento da vida de prateleira do alimento, foram realizadas análises de contagem bacteriana total – CBT, índice de rancificação (evolução oxidativa) e ensaios físico-químicos de cor, pH, umidade e atividade de água em amostras de carne bovina acondicionadas.

3.1 MATERIAIS

Gelatina suína tipo A (bloom 220 e Mesh 30), gentilmente cedida pela Gelnex The Gelatin Specialists (Itá, SC, Brasil). Enzima transglutaminase (TGase) ACTIVA[®] GS (obtida do *Streptomyces mobaraense*) doada pela Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). Glicerol P.A. (99,5%) e ácido cítrico anidro P.A. (99,5%) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O papel utilizado nos experimentos foi o papel cru da marca comercial Royal Pack (30 cm x 7,5 m).

3.2 FABRICAÇÃO DOS PAPÉIS REVESTIDOS

Os papéis ativos foram desenvolvidos no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC, em duas etapas: preparo das soluções biopoliméricas e aplicação dos revestimentos nos papéis. Posteriormente foram realizados o acondicionamento e a caracterização das amostras de alimento.

3.2.1 Preparo das soluções biopoliméricas

Duas gramas de gelatina foram hidratadas com 100 mL de água destilada utilizando agitador magnético com aquecimento, no qual a solução era solubilizada durante 60 min a 25 °C. Após isso a solução era aquecida a aproximadamente 60 °C durante 30 min, facilitando a completa solubilização da proteína em questão. Em seguida era adicionada a enzima transglutaminase (0,1 g/10 g de gelatina), o glicerol (2 g/10 g de gelatina) e o ácido cítrico em duas concentrações diferentes (0,5 % e 1,0 % em relação à massa de solução), mantendo a temperatura

a 60 °C e agitação por 15 min. Para a inativação da enzima, as soluções biopoliméricas foram submetidas a um tratamento térmico adicional por 15 min a 85 °C. Após o tratamento, as soluções biopoliméricas foram mantidas em um banho termostático a temperatura de 60 °C para posterior aplicação como revestimento no papel.

3.2.2 Aplicação do revestimento no papel

As soluções biopoliméricas foram aplicadas nas folhas de papel cru (rolos de 30 cm x 7,5 m) por técnica de pulverização com auxílio de uma pistola de ar comprimido de baixa pressão, em uma proporção estimada de aproximadamente 1 mL de solução biopolimérica/100 cm² de papel. Após aplicação da solução, as folhas de papel foram secas em temperatura ambiente durante um período de 24 h e posteriormente acondicionadas em bobinas envoltas por papel filme.

Foram estudados quatro (04) tratamentos, dentre eles: papel sem revestimento (Papel Controle ou PC), papel revestido apenas com solução de gelatina, enzima (TGase) e glicerol (Papel 1 ou P1), papel com solução de gelatina, enzima (TGase), glicerol e ácido cítrico (AC) com concentração de 0,5 % (Papel 2 ou P2), e papel com solução de gelatina, enzima (TGase), glicerol e ácido cítrico (AC) com concentração de 1,0 % (Papel 3 ou P3). Na Tabela 6 são apresentadas as formulações utilizadas nos revestimentos dos papéis fabricados.

Tabela 6 – Formulações dos revestimentos dos papéis ativos fabricados.

Tratamento	Formulação do Revestimento			
	Gelatina (g/L)	TGase (m/m gel.)	Glicerol (m/m gel.)	Ácido cítrico (%)
PC	-	-	-	-
P1	20	0,01	0,20	-
P2	20	0,01	0,20	0,5
P3	20	0,01	0,20	1,0

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PAPÉIS

Os papéis fabricados dentro dos três tratamentos estudados foram caracterizados quanto às propriedades físicas, físico-químicas, mecânicas, morfológicas, ópticas e de barreira, a fim de avaliar o efeito do revestimento aplicado em comparação ao papel original sem revestimento.

3.3.3 Morfologia de superfície

A análise morfológica dos papéis estudados foi obtida em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), marca Jeol, modelo JSM-6390LV, com fonte de elétrons de tungstênio e detector de elétrons secundários, pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para obtenção das fotomicrografias, amostras de cada tratamento foram previamente cortadas em um tamanho aproximado de 1 cm² e recobertas com uma fina camada de ouro, para posteriormente serem observadas utilizando tensões entre 10 e 15 kV.

3.3.1 Propriedades físicas

As análises das propriedades físicas de espessura, gramatura e densidade aparente foram realizadas no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.3.1.1 Espessura

Para a análise de espessura, cinco amostras dos papéis de cada tratamento foram cortadas em tamanhos de 10 x 10 cm e medidas por micrômetro externo digital Digimess[®] (Brasil) com escala de 0 – 25 mm e precisão de $\pm 0,001$ mm. Os valores de espessura nominal foram obtidos pela média de cinco pontos medidos em cada amostra (extremidades e parte central), e expressos em mm. Esta análise foi baseada na norma ABNT NBR NM ISO 534 (ABNT, 2006).

3.3.1.2 Gramatura

A análise de gramatura foi baseada na norma ABNT NBR NM ISO 536 (ABNT, 2002). Este ensaio avalia a massa por área de papel. As amostras foram cortadas em 10 x 10 cm e foram pesadas em balança analítica, obtendo-se a resposta em g/m². Foram utilizados cinco corpos-de-prova para cada determinação.

3.3.1.3 Densidade aparente do papel

A densidade aparente (ρ_a) é assim denominada, por incluir os espaços vazios do papel preenchidos por ar. Ela foi calculada através da

relação apresentada pela Equação 1, conforme descrito pela norma ABNT NBR NM ISO 534 (ABNT, 2006).

$$\rho_a(\text{g/cm}^3) = \frac{\text{Gramatura (g/m}^2\text{)}}{\text{Espessura (\mu m)}} \quad (1)$$

Obs.: a espessura em mm foi convertida para μm , para obter a densidade aparente em (g/cm^3) .

3.3.2 Propriedades mecânicas

Em relação às propriedades mecânicas dos papéis produzidos, foram realizados ensaios de tração, usando-se um medidor de ensaios universal TimeGroup[®] (China), modelo WDW-1E, equipado com uma célula de carga de 10 kN. Amostras de 50 x 25 mm foram utilizadas como corpos-de-prova para o teste de tração, com distância fixa de 50 mm entre as garras e velocidade de tração de $20 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, conforme orienta a norma ABNT NBR NM ISO 1924-2 (ABNT, 2012).

Foram realizadas cinco repetições de cada amostra nos sentidos DM (direção de máquina), e DT (direção transversal) dos papéis avaliados. Nos resultados obtidos foram determinados os componentes: força média máxima (\bar{F}^T), resistência à tração (σ_T) e alongamento máximo na ruptura (ε_T). Os valores destas propriedades foram calculados segundo as Equações 2 e 3. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

$$\sigma_T \text{ (MPa)} = \frac{\bar{F}^T}{b \cdot l} \quad (2)$$

$$\varepsilon_T \text{ (\%)} = \frac{\delta}{l} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

b = largura inicial do corpo de prova (m);

δ = alongamento na ruptura (m);

l = comprimento inicial do corpo-de-prova (m);

3.3.4 Propriedades ópticas do papel

A determinação dos parâmetros de cor foi realizada utilizando-se um colorímetro portátil (Konica Minolta[®], modelo CR-400), com fonte de luz padronizada, obtendo-se coordenadas L^* , a^* , b^* definidas pela CIE (*Comission Internationale de l'Éclairage*), onde o L^* é o cromatismo associado à luminosidade ($L^* = 0$, preto, e 100, branco), a^* é o parâmetro de cor que varia do verde (-) ao vermelho (+), e b^* é o parâmetro de cor que mede variações do azul (-) ao amarelo (+). As amostras de papel foram colocadas em superfície plana de cor branca, evitando sobreposições, e realizadas três leituras por unidade de amostra em pontos diferentes para cada tratamento em triplicata.

Por meio das coordenadas L^* , a^* e b^* , foram calculados os seguintes parâmetros: Índice de Amarelamento (*YI – Yellowness index*), Índice de Transparência (*WI – Whiteness index*) e diferença de cor (ΔE) através das Equações (5), (6) e (7), respectivamente, sugeridas por Ahmadi et al. (2012). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

$$YI = 142,86 \left(\frac{b^*}{L^*} \right) \quad (4)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2} \quad (6)$$

Onde L_0 , a_0 e b_0 são os parâmetros obtidos na placa padrão.

3.3.5 Atividade de água (a_w) do papel

As medidas de atividade de água dos papéis (a_w) foram determinadas utilizando-se um equipamento LabMaster-aw[®], Novasina AG, modelo CH-8853, operando-se à temperatura de 25 °C. As amostras em triplicata foram cortadas em formato circular com 4 cm de diâmetro e, em seguida, colocadas em cápsulas para serem inseridas no equipamento para realização da leitura direta, após a calibração do mesmo com água destilada e soluções padrão (SAL-T, Novasina com a_w de 0,064;

0,113; 0,328; 0,576; 0,753; 0,843 e 0,973). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.3.6 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi determinada pelo método gravimétrico descrito na norma ASTM E-96 (ASTM, 1995). As amostras dos papéis foram fixadas em células de permeação (6,4 cm de diâmetro interno por 4,8 cm de profundidade) contendo o dessecante (sílica gel, com diâmetro de 4 – 8 mm) para que fosse mantida a umidade relativa de 0 % no interior da célula. Posteriormente as células foram acondicionadas a temperatura ambiente em um dessecador contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa controlada de 75 %). O peso das células foi monitorado a cada 1 h durante um período total de 8 h, para que o ganho de massa fosse registrado. A inclinação do gráfico da variação da massa em função do tempo ($\Delta m/\Delta t$) foi determinada por regressão linear, obtendo-se coeficientes de correlação superiores a 0,99. A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) foi então obtida através da Equação 7, a seguir.

$$PVA = \frac{(\Delta m/\Delta t) \cdot X}{A \cdot \Delta p} \quad (7)$$

Onde:

PVA = permeabilidade ao vapor d'água (g.mm/m².h.kPa);

Δm = variação de massa da célula (g);

Δt = variação de tempo decorrido (h);

X = espessura do papel (mm);

A = área de permeabilidade (m²);

Δp = diferença de pressão parcial do vapor d'água através do papel (kPa).

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e realizados no Laboratório de Sistemas Porosos (LASIPO) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

3.3.7 Atividade antimicrobiana *in-vitro*

A detecção da atividade antimicrobiana *in-vitro* dos papéis obtidos foi avaliada através do método de difusão em disco. No “teste de halo” foram verificadas a capacidade e eficiência de inativação de seis espécies de micro-organismos de referência em alimentos, sendo três espécies Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocitogenes*; e três espécies Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*.

Segundo Jorgensen e Ferraro (1998), este método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco, o qual leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima (MIC). Esse método pode resultar em dados qualitativos e quantitativos. Na primeira, a leitura é “positiva”, quando resultar em presença de halo, e “negativa”, quando não houver halo de inibição na placa de cultura. Na segunda, faz-se a medida do raio do halo de inibição (mm), quando a presença destes for observada.

O procedimento para determinação do potencial antimicrobiano é composto por três etapas: i) ativação das cepas; ii) preparação do inóculo; e, iii) inoculação e incubação dos micro-organismos. Os procedimentos de cada etapa são descritos nos itens a seguir. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.3.7.1 Ativação das cepas

As cepas foram mantidas a -20 °C e, durante os ensaios, repicadas a cada 15 dias para tubos contendo ágar triptose de soja (TSA) mantidos a 4 °C. As culturas em TSA foram posteriormente repicadas para ágar sangue e incubadas a 35 °C por 12-18 h, a fim de se verificar a morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir destas placas, tomou-se de 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35 °C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo.

3.3.7.2 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie, diluída em solução salina 0,9 g.100 mL⁻¹ a uma concentração de aproximadamente 10⁷ UFC.mL⁻¹, comparável à solução padrão de

McFarland 0,5, verificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm, denominando-se de suspensão bacteriana.

3.3.7.3 Inoculação e incubação dos micro-organismos

A suspensão contendo a cultura já preparada e diluída em 10^7 UFC.mL⁻¹ foi utilizada para inocular placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (Oxoid-USA), utilizando-se *swab* estéril por estriamento. Pequenos discos de diâmetro 2,1 cm dos papéis PC, P1, P2 e P3 foram depositados sobre as placas inoculadas que foram incubadas a 36 °C por 18-24 horas. Antibióticos comerciais: ampicilina ($10 \mu\text{g}.\text{disco}^{-1}$) e 64 cloranfenicol ($30 \mu\text{g}.\text{disco}^{-1}$) foram usados como controle positivo. Após o período de incubação, foi realizada a avaliação do efeito inibitório. Havendo a formação de um halo de inibição, considera-se o efeito positivo antimicrobiano do aditivo. As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.8 Migração do ácido cítrico para o meio simulante

A determinação da migração do ácido cítrico dos papéis para o meio simulante foi realizada com base na resolução RDC n. 51 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010b). Para realização do ensaio foram utilizadas amostras dos papéis de dimensão 10 x 10 cm, nas quais foram adicionadas 130 mL de água destilada como meio simulante. As amostras foram acondicionadas em incubadora shaker (Novatecnica, modelo NT 712) a temperatura de 20 °C e agitação de 90 rpm, por um período de 4 h, sendo após retiradas 3 amostras de cada tratamento para determinação do ácido cítrico migrado.

Para determinação do ácido cítrico migrado para o simulante foi utilizada a técnica de titrimetria de neutralização, conforme a metodologia definida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), adaptando a concentração do titulante (NaOH) de 0,1 M para 0,01 M. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.4 APLICAÇÃO DO PAPEL NA CARNE BOVINA E AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE QUALIDADE

Após a avaliação das propriedades mecânicas, físico-químicas, colorimétricas, de barreira e atividade antimicrobiana *in vitro*, os papéis controle (PC), com 0,5 % de ácido cítrico (P2), e com 1,0 % de ácido

cítrico (P3) foram aplicados como embalagem para carne bovina e testados quanto a sua atividade duo-funcional, antioxidante e antimicrobiana, através dos índices de qualidade descritos nos itens a seguir.

3.4.1 Acondicionamento das amostras de carne

Para os ensaios de qualidade, foi utilizado corte de carne bovina (quarto traseiro) proveniente do Frigorífico e Abatedouro Piloto do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense - IFC, Campus Concórdia. A carne foi moída em discos de 5 mm e as amostras individuais contendo aproximadamente 100 g de carne moída foram acondicionadas em forma de hambúrguer completamente envoltos por apenas uma camada dos papéis produzidos. Para cada tratamento foram acondicionadas 10 amostras, correspondentes a 2 amostras para cada dia de avaliação.

Após acondicionadas, as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC, onde foram armazenadas sob refrigeração (temperatura comercial aproximada de 4 °C). O tempo total de armazenamento foi de 5 dias, sendo duas amostras de cada tratamento retiradas por dia para as avaliações microbiológicas, físico-químicas e colorimétricas.

3.4.2 Avaliação dos índices de qualidade da carne acondicionada

3.4.2.1 Contagem Bacteriana Total (CBT)

A avaliação microbiológica para determinação da Contagem Bacteriana Total (CBT) de bactérias psicotróficas foi realizada de acordo com as metodologias estabelecidas pelo “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*” (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2001). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

a) Preparação das amostras

A superfície das embalagens foi higienizada com solução de álcool 70%. Após, foram retirados com o auxílio de um bisturi previamente esterilizado aproximadamente $25 \pm 0,2$ g de amostra de cada tratamento

e colocados diretamente em “saquetas” estéreis as quais foram adicionadas 225 mL de água peptonada (Difco[®], USA) 0,1 %, obtendo-se neste procedimento a diluição 10^{-1} , que foi então homogeneizada em aparelho Estomacher (Marconi[®], São Paulo, Brasil). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais subsequentes utilizando-se o mesmo diluente.

b) Inoculação e contagem

A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada inoculando-se em profundidade 1 mL de cada uma das diluições em ágar PCA (Plate Count Agar), previamente esterilizado em autoclave. Após adição do meio de cultura as placas de petri foram homogeneizadas e deixadas solidificar naturalmente. As diluições foram inoculadas em duplicata de amostra e realizadas em capela de fluxo laminar. Após a solidificação, as placas foram incubadas em posição invertida a 36 °C por 48 h. Ao término do período de incubação, a leitura de cada placa foi realizada com auxílio de lupa para contagem das colônias, sendo que os resultados foram expressos em ciclos logarítmicos ($\log \text{UFC.g}^{-1}$).

3.4.2.2 Avaliação da oxidação da carne

O processo de oxidação das carnes embaladas nos papéis controle (PC) e ativos (P2 e P3) foi avaliado através do método do ácido tiobarbitúrico (TBA), onde a evolução da concentração de TBA demonstra a formação de compostos oxidados, conforme a metodologia adaptada de Raharjo, Sofos, e Schmidt (1992). Inicialmente foi pesado 1 g da amostra de carne embalada em cada papel, nas quais foram adicionadas 4 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5 % (m/V), juntamente com 0,1 mL de solução do antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) 0,15 % (m/V). Esta mistura foi homogeneizada por 1 minuto, filtrada em papel filtro qualitativo e transferida para um balão volumétrico de 5 mL, o qual teve seu volume completado por ácido tricloroacético (TCA) 5 % (m/V). Uma alíquota de 2 mL desta solução foi transferida para um tubo de ensaio e acrescentado 2 mL do reagente TBA 0,08 M em ácido acético 50 % (m/V), sendo esta permanecendo em banho-maria fervente por 30 minutos e posteriormente resfriado em água fria por 10 minutos. Com o conteúdo do tubo de ensaio foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, Brasil) em 531 nm. Para calibração do espectrofotômetro foi feita previamente a leitura do “branco”, que foi obtido realizando-se o mesmo

procedimento, sem a adição da amostra de carne. Os valores de TBARs (substâncias reagentes ao TBA) foram calculados a partir da Equação 8, expressos em mg de malonaldeído por kg de amostra. As análises, feitas em triplicata, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

$$\text{TBARs (mg.kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância}}{7,8} \quad (8)$$

3.4.2.3 Avaliação da coloração da carne

A determinação dos parâmetros colorimétricos da carne acondicionadas nos papéis foi realizada conforme procedimento já descrito no item 3.3.4. A leitura dos parâmetros foi executada diretamente em contato com as amostras de carne, sendo realizadas três leituras em diferentes pontos da amostra, para cada tratamento estudado. A partir dos parâmetros obtidos instrumentalmente, foi calculado o índice *Croma* (C^*), de acordo com a Equação 9 (MACDOUGALL, 1994).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (9)$$

3.4.2.4 Determinação do pH da carne

O pH das amostras de carne foi determinado com auxílio de um medidor de pH/ion de bancada da marca Analyser® (modelo 450M) equipado com eletrodo de inserção. O aparelho foi calibrado com solução tampão de pH 4,00 e pH 7,00. Foram realizadas 3 leituras em diferentes pontos da amostra para cada tratamento. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.4.2.5 Determinação da atividade de água (a_w) da carne

A atividade de água (a_w) das amostras de carne foi determinada utilizando-se um equipamento LabMaster-aw®, Novasina AG, modelo CH-8853, operando-se à temperatura de 25 °C. As amostras em triplicata foram colocadas em cápsulas e inseridas no equipamento para realização da leitura direta. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de

Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.4.2.6 Determinação da umidade da carne

A umidade da carne foi obtida através de um determinador de umidade infravermelho Marte® modelo ID 200. Aproximadamente 5 g de carne, retirados das amostras provenientes de cada tratamento, foram colocadas no equipamento para determinação do teor de umidade (%), sendo os ensaios realizados em triplicata de amostra. As análises foram executadas no Laboratório de Embalagens do Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Concórdia, SC.

3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente, quando necessário, por meio da análise de variância (ANOVA) para estimar efeitos significativos ($p < 0,05$) entre as amostras em resposta as variáveis do processo. O teste de *Tukey* foi utilizado para estimar as diferenças mínimas significativas entre as médias ao nível de 5 % de significância, com auxílio do software *Statistica* versão 10.0 (*Statsoft*).

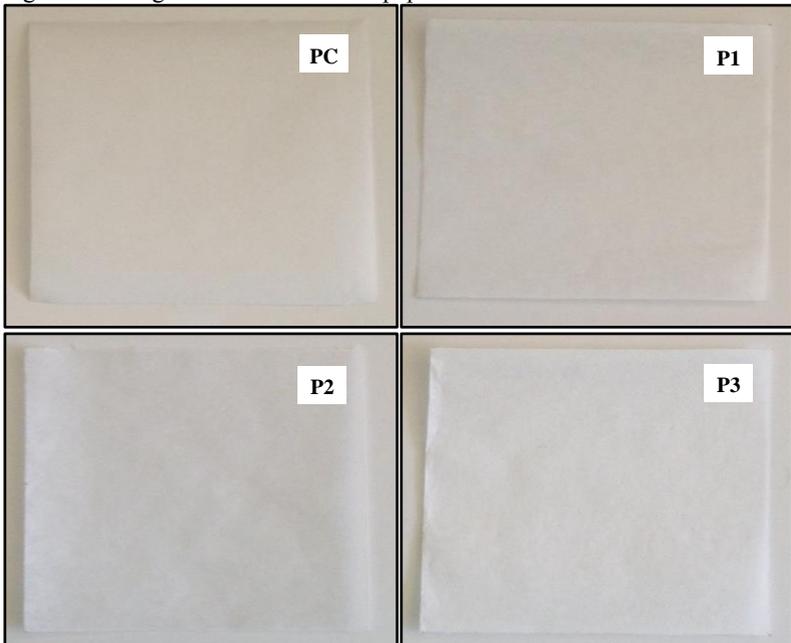
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERÍSTICAS VISUAIS DOS PAPÉIS

Na Figura 5 são apresentadas as imagens das amostras dos papéis obtidos neste estudo, conforme as formulações previamente estabelecidas na Tabela 6 (página 58): papel controle (PC), papel revestido com solução de gelatina, enzima transglutaminase e glicerol (P1), papel revestido com solução de gelatina, enzima transglutaminase e 0,5 % de ácido cítrico (P2), e papel revestido com solução de gelatina, enzima transglutaminase, glicerol e 1,0 % de ácido cítrico (P3).

Visualmente as amostras de papéis não sofreram alterações expressivas devido à aplicação do revestimento das soluções biopoliméricas. No entanto, o revestimento provocou a formação de pequenas ondulações e aspecto pouco mais quebradiço na superfície dos papéis em relação ao papel comercial sem revestimento. A explicação encontrada é que isto se deve à presença de água na solução biopolimérica, o que provocou o inchamento das fibras celulósicas do papel.

Figura 5 – Imagens das amostras dos papéis obtidos neste estudo.

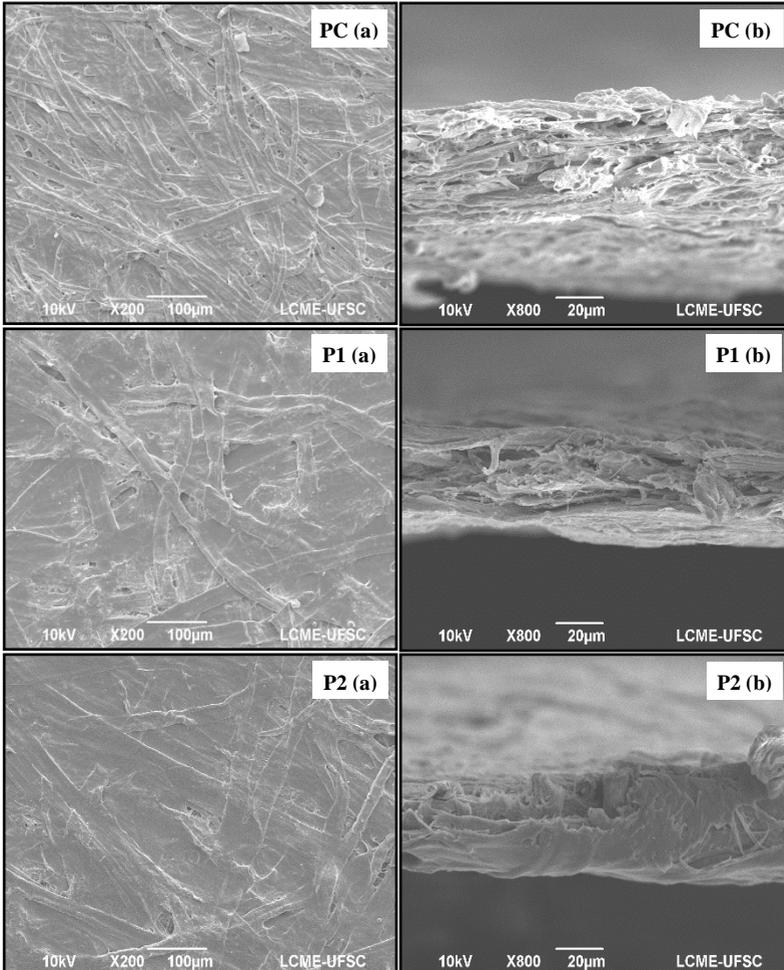


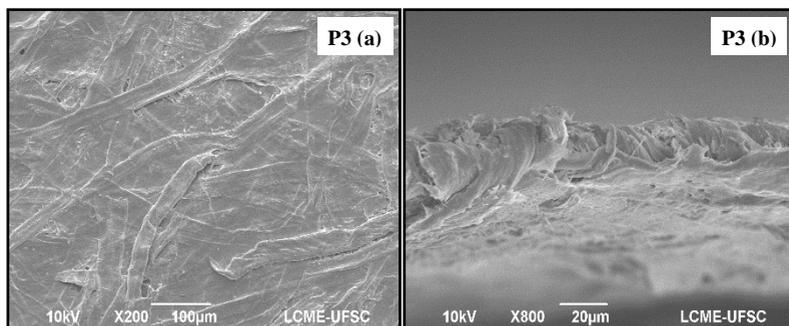
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PAPÉIS

4.2.1 Morfologia de superfície

As fotomicrografias dos papéis na vista superficial (a) e da vista em seção transversal (b), obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), estão mostradas na Figura 6.

Figura 6 – Fotomicrografias dos papéis PC, P1, P2 e P3 na vista superficial (a) com aumento de 200x, e na vista de corte transversal (b) com aumento de 800x.





Pode-se observar pelas micrografias de superfície (a) que o revestimento criou uma película homogênea e relativamente regular, que preencheu os poros das fibras celulósicas. Segundo Han e Krochta (2001) este efeito faz com que o revestimento aumente a resistência ao vapor d'água e diminua a aspereza do papel. Vê-se ainda que as fibras dos papéis revestidos (P1, P2 e P3) sofreram um inchamento, aumentando seu diâmetro se comparado com as fibras do papel sem revestimento (PC). Este inchamento das fibras é causado pela água presente na solução biopolimérica, que é evaporada após a secagem do revestimento.

Nas micrografias da vista da seção transversal pretende-se observar o formato do relevo da película criada pela aplicação do revestimento. Na imagem do papel P1 (b) fica visível a camada biopolimérica lisa e regular, orientada para baixo, que é aderida à superfície da matriz fibrosa do papel. Em alguns casos é difícil diferenciar a camada de revestimento a partir de papel, especialmente quando os dois materiais interpenetram entre si (GASTALDI et al., 2007), o que pode ter ocorrido nas fotomicrografias dos papéis P2 (b) e P3 (b).

4.2.2 Espessura, gramatura e densidade aparente

As análises de espessura, gramatura e densidade aparente estão apresentadas na Tabela 7. A gramatura é uma medida importante, pois consiste na base de comercialização do papel. A espessura está diretamente relacionada com a maquinabilidade do papel. E a densidade aparente é assim denominada por incluir os espaços vazios do papel preenchidos por ar.

Tabela 7 – Resultados das análises das propriedades físicas dos papéis.

	PC	P1	P2	P3
Espessura (mm)	0,035±0,001 ^d	0,051±0,001 ^a	0,040±0,00 ^c	0,044±0,001 ^b
Gramatura (g/m²)	33,55±0,21 ^c	41,04±0,12 ^a	34,15±0,18 ^c	36,67±0,06 ^b
Densidade aparente (g/cm³)	0,965±0,006 ^a	0,812±0,002 ^c	0,860±0,004 ^b	0,827±0,001 ^c

Nota: ^{a-d} letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de *Tukey*.

O aumento na espessura e na gramatura dos papéis revestidos (P1, P2 e P3) em comparação ao papel controle (PC) mostrou a efetividade na formação da película de revestimento. A diferença significativa entre todos os tratamentos pode ser atribuída a não uniformidade durante o processo de aplicação revestimento, que foi realizado manualmente através do uso da técnica de pulverização com pistola de ar comprimido de baixa pressão.

A densidade aparente dos papéis revestidos (P1, P2 e P3) apresentou uma diminuição significativa em relação ao papel controle (PC). Tais resultado demonstram que os papéis revestidos ocupam um maior volume quando comparado com o papel sem revestimento. Na prática, para comercialização estes papéis teriam que ser armazenados em bobinas, desta forma, as bobinas de papel revestido ocupariam um maior espaço, para um mesmo peso e comprimento de papel armazenado, se comparados ao papel sem revestimento.

4.2.3 Propriedades mecânicas

A maneira de o papel resistir à ação das forças externas, da umidade e calor, depende de sua composição fibrosa e sua formação. A resistência à tração (σ_T) e o alongamento máximo na ruptura (ε_T) são as respostas mais comumente relatadas para descrever as propriedades mecânicas de materiais de embalagem de papel e estão apresentados na

Tabela 8. Resistência mecânica e flexibilidade suficiente são propriedades necessárias para manter a integridade da embalagem durante transporte, manuseio e armazenamento (KHWALDIA et al., 2014).

Tabela 8 – Ensaio de tração para o papel controle (PC) e para os papéis com revestimento (P1, P2 e P3), nas direções de máquina (DM) e transversal (DT).

Direção do ensaio	Papel	σ_T (MPa)	ε_T (%)
DM	PC	$54,8 \pm 7,4^a$	$10,5 \pm 1,2^a$
	P1	$55,7 \pm 4,8^a$	$10,0 \pm 1,0^a$
	P2	$67,2 \pm 3,3^a$	$6,0 \pm 0,4^b$
	P3	$60,5 \pm 4,4^a$	$9,3 \pm 1,5^a$
DT	PC	$47,9 \pm 4,1^a$	$32,4 \pm 1,8^a$
	P1	$30,9 \pm 1,3^{bc}$	$28,1 \pm 0,8^b$
	P2	$25,8 \pm 2,5^c$	$14,7 \pm 1,0^d$
	P3	$33,4 \pm 4,2^b$	$19,7 \pm 2,5^c$

Nota: ^{a-d} letras diferentes na mesma coluna (DM) e (DT) representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de *Tukey*. σ_T : resistência à tração, ε_T : alongamento máximo. Umidade conforme ABNT NBR NM ISO 1924-2:2012.

Em geral, as propriedades mecânicas das películas laminadas ou revestidas em estrutura compósita são controladas pela película ou substrato de base (HONG; LEE; SON, 2005). A resistência à tração é uma medida da capacidade de uma película para resistir à quebra sob tensão, que é dependente da força de fibras, a sua área de superfície, e o comprimento, e também a resistência de ligação entre eles. Já o alongamento máximo mostra a capacidade de uma película de esticar antes de quebrar (RABINOVITCH, 2003).

Os valores de resistência à tração dos papéis na direção de máquina (DM) apresentaram um pequeno aumento com relação ao papel controle (PC), porém não mostrou ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Já na direção transversal (DT), a resistência à tração dos papéis diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para todos os três revestimentos (P1, P2 e P3) quando comparados ao papel controle (PC), revelando que o revestimento biopolimérico aplicado não teve influência positiva sobre a resistência do papel.

Com relação ao alongamento máximo na ruptura, os valores para direção de máquina (DM) dos papéis P1 e P3 não apresentaram diferença significativa em relação ao papel controle (PC), sendo que apenas o papel P2 teve seu alongamento máximo reduzido significativamente ($p < 0,05$). Já para a direção transversal (DT), todos os valores de alongamento

máximo na ruptura dos papéis com revestimento mostraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$).

Rhim et al. (2006) observaram uma diminuição na resistência à tração do papel mediante revestimento com reticulado de alginato e proteína de soja isolada. Os autores sugerem que a diminuição da resistência à tração de papéis revestidos é devida, principalmente, ao aumento de volume das fibras de celulose por meio da penetração do solvente durante o revestimento e pode ser, parcialmente, devido ao fato de que materiais de revestimento são impregnados na estrutura da celulose e desta forma venham a interferir na interação de fibra-fibra do papel.

Han e Krochta (2001) também sugeriram que tal interferência dos materiais de revestimento provoca uma redução da força de interação entre as fibras de papéis revestidos, conseqüentemente, resultando em diminuição da resistência à tração de papel revestido.

4.2.4 Propriedades ópticas

A mudança de cor do papel após o revestimento pode afetar a utilização do papel revestido. A escala de cores do *CIE Lab* (L^* , a^* e b^*) foi utilizada para quantificar a cor. A partir das coordenadas L^* , a^* e b^* , também foram calculados os seguintes parâmetros: diferença de cor (ΔE), índice de transparência (WI – *Whiteness index*) e índice de amarelamento (YI – *Yellowness index*). Na Tabela 9 estão apresentados os resultados dos parâmetros de cor obtidos para os papéis estudados.

Tabela 9 – Resultados dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , da variação de cor (ΔE), do índice de transparência (WI) e do índice de amarelamento (YI) dos papéis.

Parâmetro	PC	P1	P2	P3
L^*	90,64±0,26 ^b	91,29±0,03 ^a	91,07±0,05 ^a	91,15±0,02 ^a
a^*	-0,30±0,01 ^b	-0,30±0,01 ^b	-0,33±0,01 ^{ab}	-0,34±0,01 ^a
b^*	1,96±0,04 ^a	1,69±0,04 ^{ab}	1,49±0,23 ^b	1,80±0,04 ^{ab}
ΔE	8,76±0,26 ^a	8,10±0,03 ^b	8,32±0,05 ^b	8,24±0,02 ^b
WI	90,43±0,25 ^b	91,13±0,03 ^a	90,94±0,01 ^a	90,96±0,01 ^a
YI	3,08±0,06 ^a	2,64±0,06 ^{ab}	2,34±0,35 ^b	2,82±0,07 ^a

Nota: ^{a-d} letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de *Tukey*.

Fazendo uma análise individual dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) pode ser observado que o valor de L^* , que se refere à luminosidade, apresentou de forma generalizada um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) com a aplicação do revestimento, quando comparado com o papel controle (PC). A coordenada cromática a^* (coordenada vermelho/verde) apresentou o maior valor para o papel com 1,0 % de ácido cítrico (P3). Já a coordenada cromática b^* (coordenada amarelo/azul) mostrou uma redução na intensidade da cor amarela dos papéis revestidos (P1, P2 e P3) em comparação ao papel controle (PC).

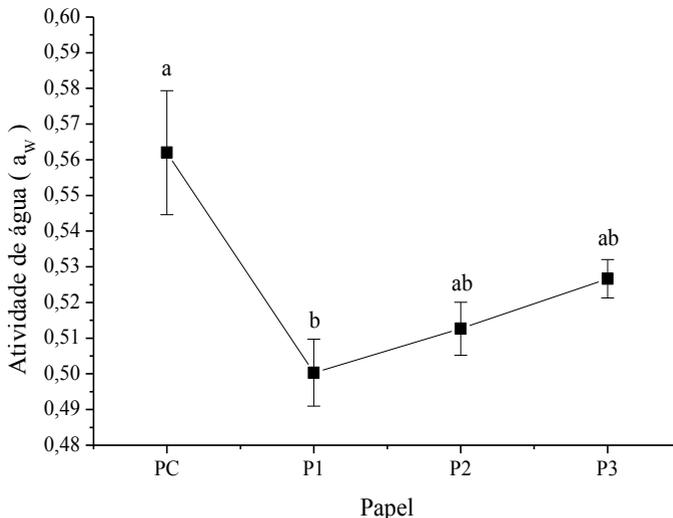
A variação total de cor (ΔE) apresentou o maior valor para o papel controle (PC), relacionado principalmente ao maior valor da intensidade de cor amarela (b^*) deste papel, comprovado também pela diminuição do Índice de Amarelamento (YI) dos papéis P1, P2 e P3. O Índice de Transparência (WI) apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para os papéis após a aplicação do revestimento com a solução biopolimérica a base de gelatina.

De forma geral, foi observado que após o revestimento os papéis apresentaram um leve aumento na luminosidade e uma leve diminuição na intensidade da cor amarela, que pode ser atribuído a própria coloração da gelatina. Apesar das diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de cor dos papéis, esta variação pode não ser perceptível ao olho humano, fato também reportado por Han e Krochta (2001) quando aplicaram revestimento de proteína isolada de soja em papel.

Para todos os efeitos práticos, o revestimento com a solução biopolimérica a base de gelatina não alterou a cor dos papéis de forma significativa e, assim, ainda fornece a mesma cor de fundo como o papel não revestido, fator este de grande importância quando se necessita aplicação de processos de impressão para comercialização.

4.2.5 Atividade de água (a_w)

A atividade de água (a_w) é um dos parâmetros mais importantes a serem controlados na conservação de alimentos, pois determina a possibilidade de proliferação de micro-organismos e a vida de prateleira de produtos perecíveis (DA SILVA; PEREIRA; DRUZIAN, 2012). Desta forma, os papéis elaborados foram investigados quanto a sua atividade de água, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Atividade de água (a_w) dos papéis elaborados.

Nota: ^{a-b} letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de *Tukey*.

Como pode ser observado, a aplicação do revestimento da solução biopolimérica reduziu a atividade de água dos papéis nos três tratamentos (P1, P2 e P3) em comparação ao papel controle sem revestimento (PC). Em contrapartida, a adição do ácido cítrico aumentou proporcionalmente a atividade de água nos papéis com 0,5 % (P2) e com 1,0 % (P3), em comparação ao papel revestido sem ácido cítrico (P1). Desta forma, apenas o papel P1 apresentou uma diferença estatisticamente significativa na atividade de água em comparação ao papel controle sem revestimento (PC).

Sabendo-se que os valores de a_w estão relacionados com a quantidade de água livre na amostra, os resultados indicam que a presença da solução biopolimérica diminuiu a disponibilidade de água nos papéis. Isto pode estar relacionado ao fato da presença de grupos amino e carboxila presentes na molécula de gelatina, além dos grupos hidroxila presentes no glicerol. Estes grupos podem interagir com as moléculas de água não ligadas presentes na matriz do papel por meio de ligações de hidrogênio, diminuindo assim a atividade de água do papel.

4.2.6 Permeabilidade ao Vapor D'água – PVA

A eficácia dos materiais de embalagem está geralmente relacionada com suas propriedades de transporte de massa. A capacidade de evitar ou, pelo menos, diminuir a transferência de umidade entre o alimento e a atmosfera no seu entorno é um ponto crítico para a manutenção da qualidade e segurança alimentar. As propriedades de transporte de materiais de embalagem revestidos são influenciadas pelo tipo de material de revestimento utilizado, a composição e a espessura do revestimento (KHWALDIA et al., 2014; TIHMINLIOGLU; ATIK; ÖZEN, 2010). Desta forma, o estudo das propriedades de barreira de vapor d'água do papel revestido com solução biopolimérica a base de gelatina é de grande importância para fins práticos e comerciais.

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para a permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos papéis controle sem revestimento (PC) e com revestimento (P1, P2 e P3).

Tabela 10 – Resultados de permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos papéis.

Papel	Espessura média (mm)	PVA (g.mm/m².h.kPa)
PC	0,035 ± 0,002	0,285 ± 0,002 ^a
P1	0,051 ± 0,001	0,262 ± 0,003 ^b
P2	0,040 ± 0,001	0,262 ± 0,004 ^b
P3	0,044 ± 0,002	0,263 ± 0,003 ^b

Nota: ^{a-b} letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

Analisando a Tabela 10, pode-se observar que o papel controle sem revestimento (PC) apresentou a maior permeabilidade ao vapor d'água (0,285±0,002 g.mm/m².h.kPa), enquanto os demais papéis após submetidos ao processo de revestimento (P1, P2 e P3) tiveram uma diminuição significativa nos valores de PVA quando comparados ao papel controle (PC). A espessura do revestimento, dentro da faixa estudada, mostrou não ter efeito estatisticamente significativo entre os valores de permeabilidade ao vapor d'água dos papéis revestidos (P1, P2 e P3).

A diminuição da permeabilidade ao vapor d'água dos papéis revestidos está relacionada com o fato da camada de revestimento biopolimérica servir como uma barreira adicional ao transporte de

umidade nos papéis. Khwaldia (2010) relata efeito similar em seu estudo, sugerindo que uma diminuição consistente nos valores de PVA de papéis revestidos com biopolímeros é devida a obstrução dos poros da estrutura celulósica do papel.

4.2.7 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Conforme descrito nos procedimentos das normas da NCCLS (2003), a avaliação da sensibilidade de micro-organismos contra uma determinada espécie química deve ser feita primeiramente de forma qualitativa. Desta forma, para verificar a ação do ácido cítrico, foram testadas diferentes espécies de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes com relevante influência na conservação de alimentos. Os resultados de sensibilidade estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados dos antibiogramas de bactérias Gram positivas e Gram negativas com relevante importância em alimentos.

Micro-organismo	Gram	Resultado
<i>Bacillus cereus</i>	+	Negativo
<i>Listeria monocitogenes</i>	+	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	-	Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Positivo

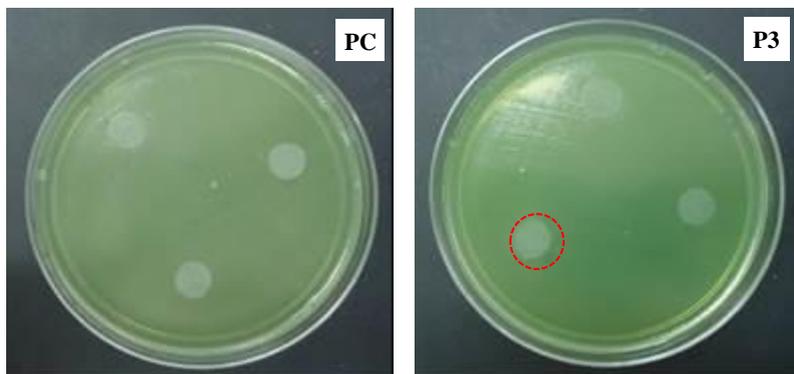
Dentre as espécies de micro-organismos testadas, observou-se ação inibitória apenas para a *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa). Para as demais espécies não houve formação de halo de inibição ao redor dos papéis, porém, não se pode afirmar que não houve atividade antimicrobiana, já que esta pode ocorrer sem a difusão radial dos compostos ativos, resultando em uma inibição dos micro-organismos em contato direto com a superfície do papel, como apontado por Brody et al., (2001) em seu estudo com filmes de quitosana.

Nakai e Siebert, (2004) ao avaliarem a atividade inibitória de *Pseudomonas aeruginosa* inoculada em meio BHI (Brain Heart Infusion), verificaram que dentre os micro-organismos testados, *P. aeruginosa* foi bastante susceptível à maior parte dos ácidos orgânicos testados, inclusive ao ácido cítrico.

Na Figura 8, pode ser visualizado o resultado do teste de atividade antimicrobiana *in vitro* para a cepa de *P. aeruginosa*, onde se pode observar que houve formação de halo de inibição no antibiograma

qualitativo apenas para o papel com 1,0 % de ácido cítrico (P3), em comparação ao papel controle, onde, como já esperado, não houve nenhuma formação de halo de inibição.

Figura 8 – Antibiogramas dos papéis controle (PC) e com 1,0 % de ácido cítrico (P3) contra *P. aeruginosa*.



Para avaliar quantitativamente a ação inibitória do agente ativo frente ao micro-organismo sensível (*P. aeruginosa*), procedeu-se a medição do diâmetro do halo de inibição, conforme apresentado na Tabela 12.

O papel P3 (com 1,0 % de ácido cítrico) apresentou o maior halo de inibição, quando comparado com os antibióticos comerciais ampicilina ($10 \mu\text{g}.\text{disco}^{-1}$) e 64 cloranfenicol ($30 \mu\text{g}.\text{disco}^{-1}$), que foram usados como controle positivo.

Tabela 12 – Diâmetros dos halos de inibição contra *P. aeruginosa*.

Tratamento	Diâmetro (mm)
Papel P3 (com 1,0 % de ácido cítrico)	$15,0 \pm 0,0^a$
Ampicilina comercial ($10 \mu\text{g}.\text{disco}^{-1}$)	$11,8 \pm 2,6^a$
Cloranfenicol comercial ($30 \mu\text{g}.\text{disco}^{-1}$)	$7,0 \pm 0,0^a$

Nota: ^a letras iguais na mesma coluna não representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

A efetiva inibição de *P. aeruginosa* é um resultado promissor, visto que este micro-organismo é um membro do mais importante grupo de bactérias deteriorantes em alimentos frescos refrigerados (NAKAI; SIEBERT, 2004), em especial na carne, pois é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração (2 a 5 °C), sendo os chamados micro-

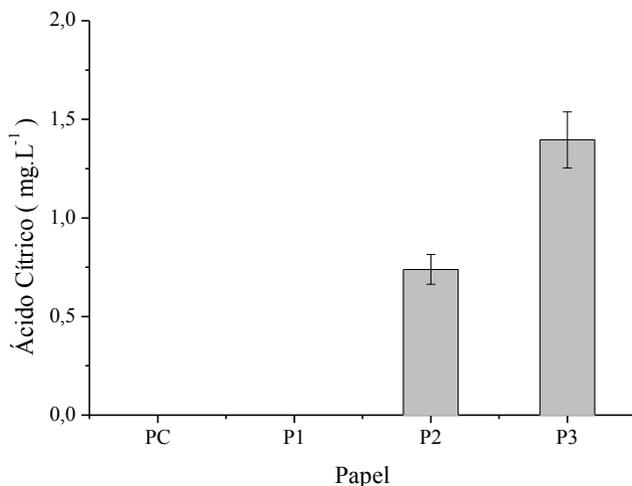
organismos psicrotróficos. O crescimento de *Pseudomonas* na carne é acompanhado de intensa atividade proteolítica, o que resulta em evidente acréscimo dos níveis de NNP (nitrogênio não proteico), principalmente sob a forma de peptídeos e amônia (ANTUNEZ et al., 2006).

4.2.8 Migração do ácido cítrico para o meio simulante

A Figura 9 apresenta a migração do ácido cítrico incorporado no revestimento dos papéis para o meio simulante, neste caso a água destilada, durante o período de acondicionamento. Os resultados demonstram que para os papéis revestidos P2 e P3, foram detectadas quantidades de $0,096 \pm 0,008$ mg e $0,181 \pm 0,018$ mg de ácido cítrico no meio simulante, o que corresponde a uma concentração de ácido cítrico migrada de $0,74 \pm 0,075$ mg.L⁻¹ e $1,40 \pm 0,14$ mg.L⁻¹ respectivamente.

Sabendo que os papéis P2 e P3 contém respectivamente 0,5 % e 1,0 % de ácido cítrico em relação a massa de gelatina em sua composição de revestimento, e que o volume de solução biopolimérica empregado foi de aproximadamente 1 mL a cada 100 cm² de papel, a quantidade teórica de ácido cítrico que as amostras dos papéis revestidos P2 e P3 contém são de 0,1 mg e 0,2 mg, respectivamente. Sendo assim, pode-se estimar que 96,0 % do ácido cítrico contido no papel P2 e 90,5 % contido no papel P3 tenham migrado para o meio simulante.

Figura 9 – Ensaio de migração do ácido cítrico para o meio simulante.



A taxa de liberação de um agente ativo a partir do material de embalagem para um ambiente é influenciada por inúmeros fatores, como a polaridade e a hidrofiliçidade (KUORWEL et al., 2013; VARGAS JÚNIOR et al., 2015), o que pode explicar a facilidade de migração do ácido cítrico a partir do revestimento do papel para a água, que foi utilizada como um meio simulante.

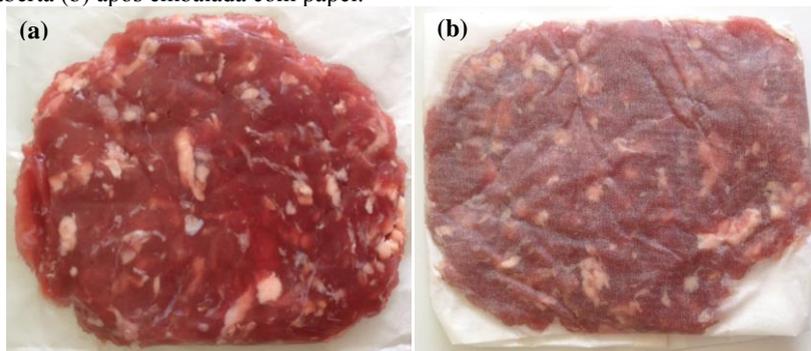
4.3 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE QUALIDADE DA CARNE

4.3.1 Acondicionamento da carne

O resultado visual do acondicionamento das amostras de carne na forma de hambúrgueres pode ser observado na Figura 10. Os hambúrgueres foram confeccionados com aproximadamente 100 g e posteriormente envoltos com os papéis nos respectivos tratamentos, controle (PC), com 0,5 % de ácido cítrico (P2) e com 1,0 % de ácido cítrico (P3).

Todos os papéis apresentaram boa aderência e maquinabilidade no momento da embalagem, sendo que não houve sinais de rasgos em nenhum dos papéis utilizados para confecção dos hambúrgueres. Para o envoltório foi utilizado apenas uma camada de papel para cada hambúrguer. Este resultado mostra-se interessante sob o aspecto da utilização em larga escala dos papéis como envoltório para carnes de comercialização rápida, em substituição aos tradicionais filmes e sacos plásticos.

Figura 10 – Amostras de carne acondicionadas na forma de hambúrgueres: (a) aberta (b) após embalada com papel.

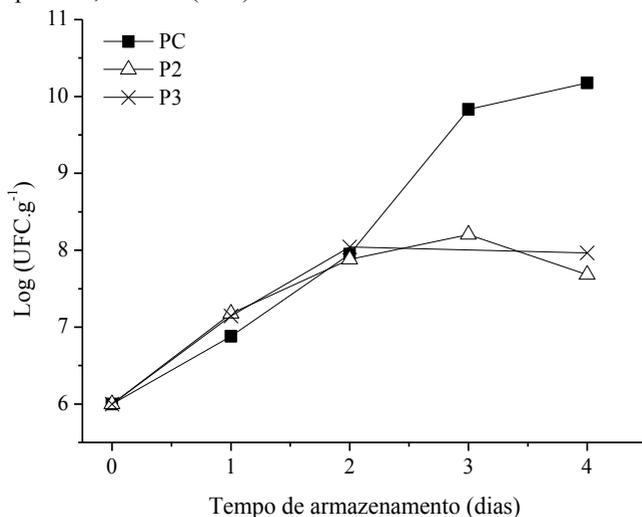


4.3.1 Contagem bacteriana total (CTB) na carne

De acordo com Zhou et al. (2010), inúmeros fatores influenciam a vida de prateleira e a qualidade da carne, dentre eles, mais especificamente a temperatura, o oxigênio (O_2), a umidade, a luz e, mais importante ainda, os micro-organismos. Todos estes fatores, sozinhos ou em combinação, podem resultar em mudanças prejudiciais na cor, odor, sabor e na textura da carne. Embora a deterioração de carne possa ocorrer na ausência de micro-organismos (por exemplo, a proteólise, a lipólise e oxidação), o crescimento microbiano é, de longe, o fator mais importante em relação à qualidade de conservação da carne fresca.

Na Figura 11 são apresentados os resultados obtidos da contagem bacteriana total (CBT) para a carne embalada nos papéis ativos (P2 e P3) e no papel controle (PC), ao longo do período de armazenamento. Inicialmente todas as amostras dos diferentes tratamentos partiram de um valor de CBT de $1,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (6 log UFC.g⁻¹), oriundo da determinação da Contagem Bacteriana Total da carne utilizada na preparação dos hambúrgueres.

Figura 11 – Contagem bacteriana total (CTB) das carnes embaladas com os papéis PC, P2 e P3 (4 °C).



A elevação da população microbiana se manteve constante entre os tratamentos até o segundo dia de armazenamento, sendo que a partir do terceiro dia de armazenamento foi detectado um grande aumento da

CBT para o papel controle (PC) em relação aos papéis ativos (P2 e P3). No quarto dia de armazenamento essa diferença se mostrou ainda mais expressiva, resultando em uma diminuição na ordem de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos da população microbiana nos papéis ativos P2 e P3 ($4,8 \times 10^7$ e $9,2 \times 10^7$ UFC.g⁻¹) em comparação ao papel controle PC ($1,5 \times 10^{10}$ UFC.g⁻¹).

Tal redução está associada ao efeito antimicrobiano do ácido cítrico contido nos papéis ativos, conforme relatado por outros autores quando se utilizam ácidos orgânicos na conservação de alimentos. Segundo González-Fandos, Herrera, e Maya (2009), em geral, a utilização de ácidos orgânicos (1-3%) reduz o número de bactérias por 1-2 ciclos logarítmicos. Os autores observaram que o tratamento com ácido cítrico (2 %) em coxas de frango reduziu a contagem de mesófilos entre 0,45 e 1,08 log UFC.g⁻¹, em comparação ao controle durante o período de armazenamento.

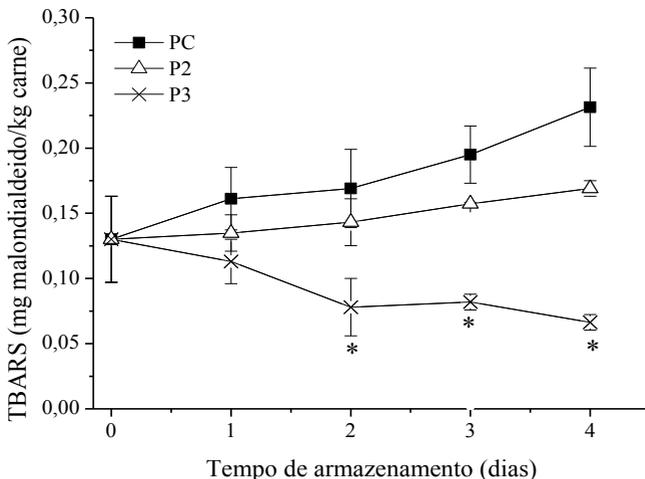
Vargas Júnior et al. (2015) observaram uma redução de aproximadamente 1 log da população microbiana no final do período de avaliação (6,44 e 7,46 log UFC.g⁻¹) para o acondicionamento de carne bovina em embalagem ativa de amido e polietileno de baixa densidade linear (PEBLD) contendo ácido cítrico, em comparação ao controle.

4.3.2 Oxidação da carne

Segundo Fernández, Pérez-Álvarez, e Fernández-López (1997), a oxidação de lipídios é uma das alterações mais importantes que ocorrem durante o armazenamento do alimento, pois pode afetar a cor, aroma, sabor, textura, e até mesmo o valor nutritivo dos alimentos. O método TBA é o teste mais utilizado para medir a evolução da oxidação de lipídios nos produtos cárneos, pois quantifica os níveis de malondialdeído, permitindo a avaliação do desenvolvimento de ranço na carne (LADEIRA et al., 2014).

A Figura 12 mostra a evolução da oxidação lipídica, representada pelos valores de TBARS das carnes embaladas durante o período de armazenamento. Os resultados demonstram que a oxidação dos lipídios na carne embalada no papel sem revestimento (PC) foi maior durante todo o período de armazenamento, sendo que a partir do segundo dia observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de TBARS na carne embalada no papel P3 em comparação aos demais tratamentos.

Figura 12 – Evolução dos níveis de TBARS durante o armazenamento (4 °C).



Nota: (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos em cada dia, obtidas através do teste de *Tukey*.

Ao final do armazenamento, a carne embalada no papel controle (PC) apresentou um valor de $0,23 \pm 0,03$ mg de malondialdeído. kg^{-1} de carne, enquanto as carnes embaladas nos papéis ativos atingiram valores de $0,17 \pm 0,01$ e $0,07 \pm 0,01$ mg de malondialdeído. kg^{-1} de carne para os papéis P2 e P3 respectivamente. Desta forma, as embalagens ativas P2 e P3 resultam em uma inibição de aproximadamente 27 % e 71 % da formação de malondialdeído, respectivamente.

Em um estudo utilizando cortes cárneos bovinos, Ke et al., (2009) reportaram a eficácia do ácido cítrico na prevenção da oxidação lipídica da carne através do método do TBA, além da melhoria observada na textura do produto. Assim, considerando que o ácido cítrico é reconhecidamente descrito na literatura como um efetivo antioxidante, a maior redução nos níveis de TBARS para o papel P3 está correlacionada com a migração deste agente ativo, haja visto que o papel P3 possui a maior concentração de ácido cítrico na formulação de seu revestimento e, conseqüentemente, apresentou a maior taxa de migração para o meio simulante (conforme mostrado na seção 4.2.8).

Djenane et al. (2001) e McKenna et al. (2005) relatam ainda que a taxa de oxidação lipídica pode também atuar como um indicador do grau de susceptibilidade do pigmento da carne à oxidação, tendo em vista a estreita relação entre estes dois processos de oxidação.

4.3.3 Coloração da carne

A cor é um atributo sensorial vital, uma vez que afeta a decisão dos consumidores na compra da carne. A cor desejável para a carne fresca é o vermelho brilhante cereja, que muda para uma cor marrom indesejável ao longo do tempo devido à oxidação de oximioglobina para metamioglobina (MOORE et al., 2003). Os resultados dos parâmetros instrumentais de coloração da carne embalada nos papéis controle (PC) e ativos (P2 e P3) estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados dos parâmetros de cor L*, a*, b* e Croma (C*) para as carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 (T ≅ 4 °C).

Parâmetro	Dias	PC	P2	P3
L*	0	39,7 ± 2,9 ^{aA}	39,7 ± 2,9 ^{aA}	39,7 ± 2,9 ^{aA}
	1	39,5 ± 0,9 ^{abA}	36,5 ± 2,0 ^{aA}	36,0 ± 1,7 ^{aA}
	2	36,9 ± 0,8 ^{abcA}	36,8 ± 0,9 ^{aA}	38,2 ± 0,9 ^{aA}
	3	34,2 ± 1,3 ^{cA}	38,5 ± 1,1 ^{aA}	38,0 ± 2,0 ^{aA}
	4	34,8 ± 1,3 ^{bcA}	37,4 ± 1,1 ^{aA}	36,2 ± 1,3 ^{aA}
a*	0	22,5 ± 3,6 ^{aA}	22,5 ± 3,6 ^{aA}	22,5 ± 3,6 ^{aA}
	1	17,5 ± 1,0 ^{abA}	19,8 ± 0,6 ^{aA}	18,1 ± 0,2 ^{aA}
	2	15,4 ± 1,1 ^{abA}	15,8 ± 0,8 ^{aA}	16,4 ± 1,8 ^{aA}
	3	15,4 ± 1,3 ^{abA}	16,1 ± 0,5 ^{aA}	15,8 ± 0,5 ^{aA}
	4	13,9 ± 1,1 ^{bA}	16,2 ± 2,7 ^{aA}	16,3 ± 0,4 ^{aA}
b*	0	16,0 ± 4,3 ^{aA}	16,0 ± 4,3 ^{aA}	16,0 ± 4,3 ^{aA}
	1	10,7 ± 0,7 ^{abA}	10,2 ± 1,9 ^{aA}	8,9 ± 0,5 ^{bA}
	2	8,2 ± 0,7 ^{bA}	7,1 ± 1,7 ^{aA}	7,6 ± 1,8 ^{bA}
	3	6,1 ± 0,4 ^{bB}	8,6 ± 0,7 ^{aA}	7,0 ± 0,2 ^{bAB}
	4	6,8 ± 0,5 ^{bA}	6,8 ± 0,1 ^{aA}	6,0 ± 0,3 ^{bA}
C*	0	27,6 ± 5,4 ^{aA}	27,6 ± 5,4 ^{aA}	27,6 ± 5,4 ^{aA}
	1	20,4 ± 0,7 ^{abA}	20,9 ± 2,7 ^{abA}	20,3 ± 0,3 ^{aA}
	2	17,6 ± 1,2 ^{abA}	16,8 ± 2,1 ^{bA}	18,4 ± 2,5 ^{aA}
	3	16,6 ± 1,1 ^{abA}	17,8 ± 0,6 ^{bA}	17,3 ± 0,4 ^{aA}
	4	15,8 ± 1,6 ^{bA}	17,5 ± 2,7 ^{abA}	17,4 ± 0,5 ^{aA}

Nota: letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não representam diferença significativa (p<0,05) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

Os valores da coordenada instrumental L^* , que indica a luminosidade, apresentaram uma redução significativa ($p > 0,05$) para a carne embalada no papel controle (PC) ao longo do período de armazenamento, enquanto que para as carnes embaladas nos papéis P2 e P3 não foi observado redução estatisticamente significativa, demonstrando que as carnes mantiveram um brilho ou luminosidade maior quando em contato com as embalagens ativas.

Comportamento similar foi observado para o parâmetro a^* , que indica a intensidade da coloração vermelha (desejável), onde a carne embalada no papel controle (PC) apresentou uma redução significativa ($p > 0,05$) durante o período de armazenamento, enquanto as carnes embaladas nos papéis P2 e P3 mantiveram sua coloração vermelha sem diferença estatisticamente significativa.

Camo et al. (2011) sugere que valores instrumentais de a^* acima de 15 são indicativos de um vermelho brilhante ainda desejável. Apesar dos papéis não apresentarem diferença significativa entre si, no quarto dia de armazenamento observou-se que o valor de a^* para o papel controle (PC) foi de $13,9 \pm 1,1$, enquanto que para os papéis P2 e P3 foram de $16,2 \pm 2,7$ e $16,3 \pm 0,4$, respectivamente, indicando que as carnes acondicionadas nas embalagens ativas apresentaram uma coloração vermelha mais acentuada ao final do período de armazenamento.

Outro parâmetro importante a ser analisado é o *Croma* (C^*), que representa a intensidade de cor e é um bom indicador de *blooming* (isto é, a mioglobina torna-se oxigenada, como o oxigênio é absorvido pela carne para formar oximioglobina, pigmento caracteristicamente vermelho que faz com que a carne passe da cor púrpura para a cor adequada de vermelho) na carne recém-exposta ao ar (LADEIRA et al., 2014). As carnes embaladas nos papéis PC e P2 apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores de *Croma* ao longo do período de armazenamento, enquanto apenas a carne embalada no papel P3, com maior concentração de ácido cítrico, manteve a intensidade de coloração vermelha sem apresentar redução estatisticamente significativa.

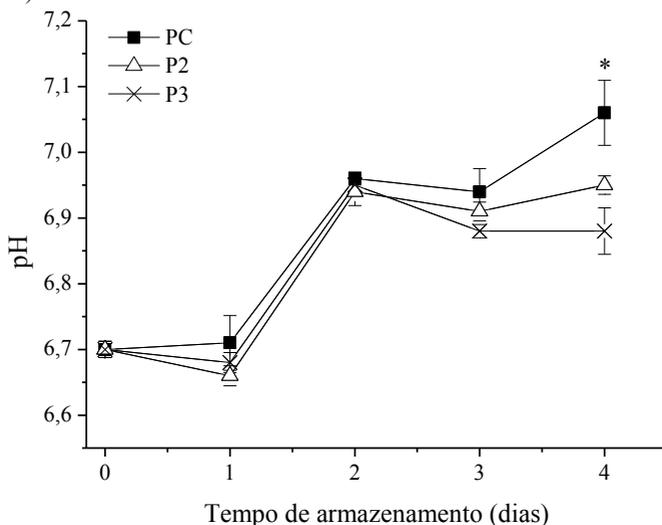
A perda da coloração vermelha superficial da carne está intimamente relacionada com a taxa de oxidação da oximioglobina para metamioglobina (RODRÍGUEZ; BATLLE; NERÍN, 2007). Além disso, oxidação lipídica também é responsável pelo desenvolvimento de sabores rançosos e mudanças na cor da carne (JAKOBSEN; BERTELSEN, 2000). Diante do exposto, o resultado quanto à manutenção da coloração vermelha nas carnes embaladas com os papéis ativos possivelmente está relacionado com a presença do ácido cítrico contido no revestimento dos papéis, cuja migração para a superfície da carne e sua atividade

antioxidante inibe processos oxidativos, prevenindo consequentemente a exibição de uma coloração marrom indesejável para a carne.

4.3.4 pH da carne

O resultado da avaliação do pH das carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 está apresentado na Figura 13. Pode-se observar que os valores de pH das carnes embaladas nos três tratamentos mantiveram-se em patamares iguais estatisticamente ($p>0,05$) até o terceiro dia de armazenamento, sendo que no quarto (último) dia de armazenamento as carnes embaladas nos papéis ativos P2 e P3 apresentaram valores de pH significativamente inferiores ($p<0,05$) quando comparadas com a carne embalada no papel controle PC.

Figura 13 – Avaliação do pH das carnes embaladas com os papéis PC, P2 e P3 (4 °C).



Nota: (*) representa diferença significativa ($p<0,05$) entre as médias dos tratamentos em cada dia, obtidas através do teste de Tukey.

Segundo Lorenzo, Batlle, e Gómez (2014), o pH reflete diretamente a qualidade microbiológica da carne, sendo que altos valores de pH estão relacionados a um maior número de micro-organismos deteriorantes, resultando em uma elevada degradação de proteínas para produção de aminoácidos livres que levam a formação de amônia (NH_3) e aminas, produtos de reação alcalina. Esta evidência fica corroborada,

pois no último dia armazenamento, além de apresentar a maior contagem bacteriana total (CBT), também foi atingido o maior valor de pH na carne embalada no papel controle PC, sem proteção ativa do ácido cítrico.

4.3.5 Atividade de água (a_w) da carne

Alimentos com elevada disponibilidade de água, tais como produtos cárneos, estão susceptíveis ao crescimento de bactérias e bolores que resultam em perdas de qualidade e redução no prazo de validade (REALINI; MARCOS, 2014). Diante disso, foi avaliado o efeito dos papéis na atividade de água (a_w) das carnes embaladas. Nota-se que o valor inicial da a_w das carnes foi de 0,962, sendo que as determinações posteriores durante o período de armazenamento não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre as medidas, conforme pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados para a atividade de água (a_w) das carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 (4 °C).

Dias	a_w		
	PC	P2	P3
0	0,962 ± 0,005 ^{aA}	0,962 ± 0,005 ^{aA}	0,962 ± 0,005 ^{aA}
1	0,962 ± 0,001 ^{aA}	0,961 ± 0,000 ^{aA}	0,963 ± 0,005 ^{aA}
2	0,965 ± 0,001 ^{aA}	0,965 ± 0,000 ^{aA}	0,967 ± 0,002 ^{aA}
3	0,967 ± 0,001 ^{aA}	0,967 ± 0,002 ^{aA}	0,968 ± 0,002 ^{aA}
4	0,967 ± 0,001 ^{aA}	0,968 ± 0,000 ^{aA}	0,970 ± 0,007 ^{aA}

Nota: letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não representam diferença significativa ($p<0,05$) entre as médias obtidas através do teste de *Tukey*.

Vargas Júnior (2014) obteve resultado semelhante ao comparar o efeito de filmes compostos de amido e PELBD (controle e ativo) na atividade de água da carne bovina. O autor constatou que os filmes apresentaram comportamentos similares com relação à a_w do produto durante todo período de armazenamento, demonstrando que mesmo com a incorporação de amido ocorreu a manutenção da a_w do produto embalado em níveis semelhantes a um filme tradicional (feito somente de PELBD).

4.3.6 Umidade da carne

A Tabela 15 apresenta os resultados da avaliação da umidade (%) das carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3. Até o terceiro dia de armazenamento não houve alteração significativa ($p > 0,05$) no conteúdo de umidade das carnes embaladas nos três tratamentos, porém no quarto (último) dia de armazenamento foi observado uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no teor de umidade da carne embalada no papel controle (PC), quando comparada com as carnes embaladas nos papéis P2 e P3.

Tabela 15 – Umidade das carnes embaladas nos papéis PC, P2 e P3 (4 °C).

Dias	Umidade (%)		
	PC	P2	P3
0	73,2 ± 2,1 ^{aA}	73,2 ± 2,1 ^{aA}	73,2 ± 2,1 ^{aA}
1	70,2 ± 7,0 ^{aA}	72,8 ± 2,2 ^{aA}	72,7 ± 1,1 ^{aA}
2	74,9 ± 0,9 ^{aA}	75,0 ± 0,3 ^{aA}	73,4 ± 2,4 ^{aA}
3	73,6 ± 0,6 ^{aA}	73,5 ± 1,3 ^{aA}	74,0 ± 1,2 ^{aA}
4	64,0 ± 1,1 ^{aB}	73,2 ± 2,6 ^{aA}	72,7 ± 1,4 ^{aA}

Nota: letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não representam diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de *Tukey*.

Tal redução no teor de umidade da carne embalada no papel controle (PC) pode estar associada ao fato de que este papel não possui o revestimento biopolimérico a base de gelatina industrial. Desta forma, o revestimento presente nos papéis P2 e P3 estaria atuando como barreira para evitar a perda de umidade da carne embalada, fato que corrobora o resultado da menor permeabilidade ao vapor d'água dos papéis revestidos (apresentado no item 4.2.6).

Segundo Gennadios, Hanna, e Kurth (1997), a perda de umidade durante o armazenamento de carnes frescas ou congeladas leva a alterações na textura, sabor e cor, ao mesmo tempo que reduz o peso de venda do produto. Além disso, a evaporação excessiva de água através do material de embalagem pode resultar na desidratação do alimento embalado e pode favorecer a oxidação lipídica (VERMEIREN et al., 1999). Assim, os resultados apontam que o revestimento biopolimérico pode atuar de forma positiva no controle da umidade da carne embalada, assegurando suas características desejáveis por um maior tempo.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho proporcionou a elaboração e caracterização de embalagens celulósicas revestidas com solução biopolimérica a base de gelatina industrial, reticulada com enzima transglutaminase, contendo glicerol como plastificante e incorporadas com ácido cítrico como agente ativo para o controle de processos microbiológicos e oxidativos em carne bovina refrigerada.

A formação das películas de revestimento constituídas de biopolímero foi efetiva, as quais têm potencial para substituição dos atuais materiais de origem fóssil e que são utilizados no recobrimento de embalagens. Apesar de não proporcionar melhorias nas propriedades mecânicas, a camada de revestimento levou a uma redução significativa na atividade de água dos papéis e na permeabilidade ao vapor d'água, o que tem influência direta na difusão de umidade para o alimento e conseqüentemente no controle microbiológico. Além disso, o revestimento teve pouca influência sobre as propriedades ópticas originais do material.

A formulação biopolimérica contendo 1,0 % (m/m) de ácido cítrico em sua composição (P3) levou à formação de halo de inibição para o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa*, resultado promissor, visto que este micro-organismo é um membro do mais importante grupo de bactérias deteriorantes em alimentos frescos refrigerados.

Os revestimentos ativos presentes nos papéis P2 e P3 proporcionaram uma menor carga microbiológica para as carnes embaladas, confirmado pelos valores de pH, além de sustentarem a coloração vermelha (desejável) da carne por um maior período de tempo. As carnes embaladas nos papéis ativos (P2 e P3) mostraram ainda estarem menos susceptíveis à oxidação lipídica e perda de umidade durante o período de armazenamento, o que leva a inferir que estes papéis atuaram de forma positiva no controle e na manutenção das propriedades desejáveis da carne.

Desta forma, conclui-se que os papéis revestidos com solução biopolimérica ativa se apresentam como uma alternativa viável para o acondicionamento de carne bovina fresca, em um sistema de comercialização rápida, tanto no que diz respeito ao prolongamento da vida de prateleira como pelas características de biodegradabilidade e sustentabilidade.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar diferentes métodos e técnicas de revestimento para a solução biopolimérica;
- Avaliar a incorporação de outros ácidos orgânicos como agentes ativos em comparação ao ácido cítrico;
- Estudar a migração e o efeito da gelatina e da enzima transglutaminase na carne;
- Explorar a eficiência dos papéis ativos em diferentes alimentos;
- Realizar a análise sensorial dos produtos para teste de aceitabilidade;
- Avaliar o custo de produção dos papéis ativos.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR NM ISO 536**. Papel e cartão - Determinação da gramatura, 2002.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR NM ISO 534**. Papel e cartão - Determinação da espessura, densidade e volume específico, 2006.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR NM ISO 1924-2**. Papel e cartão - Determinação das propriedades de tração, 2012.

AHMADI, R., KALBASI-ASHTARI, A., OROMIEHIE, A., YARMAND, M. S., JAHANDIDEH, F. Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata Forsk*). **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 4, p. 745–751, 2012.

AKRAMI, F., RODRÍGUEZ-LAFUENTE, A., BENTAYEB, K., PEZO, D., GHALEBI, S. R., NERÍN, C. Antioxidant and antimicrobial active paper based on *Zataria* (*Zataria multiflora*) and two cumin cultivars (*Cuminum cyminum*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 929–933, 2015.

ALOUI, H., KHWALDIA, K., SLAMA, M. BEN, HAMDI, M. Effect of glycerol and coating weight on functional properties of biopolymer-coated paper. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 1063–1072, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington, D.C., 2001. p. 676

ANTUNEZ, H. C. DA S., COSTA, C. S., DA SILVA, W. P., SOARES, G. J. D. Efeito do ácido láctico e da radiação gama na eliminação de *pseudomonas spp.* e na produção de amônia em peito de frango desossado resfriado. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 17, p. 367–372, 2006.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113–126, 2002.

ARFA, A. BEN, PREZIOSI-BELLOY, L., CHALIER, P., GONTARD, N. Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinnamaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2155–2162, 2007.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E96/E96M-10**. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission. Annual Book of ASTM Standards, v. 04, p. 1–12, 1995.

BARBOSA-PEREIRA, L., ANGULO, I., LAGARÓN, J., PASEIRO-LOSADA, P., CRUZ, J. Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p. 9, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº. 12 de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. D.O.U. - Diário Oficial da União, 2001.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003**. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva (corned beef) e carne moída de bovino, 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008**. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010**. Dispõe sobre

aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), 2010a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 51, de 26 de novembro de 2010.** Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos, 2010b.

BRODY, A. L.; STRUPINSKY, E. P.; KLINE, L. R. **Active Packaging for Food Applications.** Ilustrada ed. Taylor & Francis, 236 p., 2001.

CALATAYUD, M., LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., LÓPEZ-CARBALLO, G., VÉLEZ, D., HERNÁNDEZ MUÑOZ, P., GAVARA, R. Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 51–58, 2013.

CAMO, J., LORÉS, A., DJENANE, D., BELTRÁN, J. A., RONCALÉS, P. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. **Meat Science**, v. 88, n. 1, p. 174–178, 2011.

CARGILL. **Produtos Cítricos: Ácido Cítrico Anidro.** Uberlândia, 2000.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat science**, v. 78, n. 1-2, p. 90–103, jan. 2008.

COOKSEY, K. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 10, p. 980–987, out. 2005.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase.** 2011. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras.

DA SILVA, J. B. A; PEREIRA, F. V; DRUZIAN, J. I. Cassava Starch-Based Films Plasticized with Sucrose and Inverted Sugar and

Reinforced with Cellulose Nanocrystals. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 6, p. 14–19, 2012.

DAINELLI, D., GONTARD, N., SPYROPOULOS, D., ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN, E., TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 1, 2008.

DJENANE, D., SÁNCHEZ-ESCALANTE, A., BELTRÁN, J. A., RONCALÉS, P. Extension of the Retail Display Life of Fresh Beef Packaged in Modified Atmosphere by Varying Lighting Conditions. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 1, p. 181–186, 2001.

ECHEGOYEN, Y.; NERÍN, C. Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. **Food Chemistry**, v. 170, p. 30–36, 2015.

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 345–353, 1997.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRONZA, N. **Filmes Poliméricos com Adição de Agente Antimicrobiano a base de Prata: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação em Cortes de Carne Bovina**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

GÄLLSTEDT, M.; HEDENQVIST, M. S. Packaging-related mechanical and barrier properties of pulp-fiber-chitosan sheets. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 1, p. 46–53, 2006.

GASTALDI, E., CHALIER, P., GUILLEMIN, A., GONTARD, N. Microstructure of protein-coated paper as affected by physico-chemical properties of coating solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 301, n. 1-3, p. 301–310, 2007.

GENNADIOS, A.; HANNA, M. A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. **Food Science and Technology - Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n. 4, p. 337–350, 1997.

GÓMEZ-GUILLÉN, GIMENEZ, B., LOPEZ-CABALLERO, M. E., MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.

GONZÁLEZ-FANDOS, E.; HERRERA, B.; MAYA, N. Efficacy of citric acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 262–268, 2009.

GORELIK, S.; KANNER, J. Oxymyoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation initiated by iron redox cycle: Prevention of oxidation by enzymic and nonenzymic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5945–5950, 2001.

HAN J. H. **Antimicrobial food packaging**. Washington, D. C.: Elsevier Science, 2003. p. 69–89

HAN, J. H. **Antimicrobial Packaging Systems**. London, UK: Elsevier Science, 2005. p. 80–101

HAN, J. H.; KROCHTA, J. M. Physical Properties and Oil Absorption of Whey-Protein-Coated Paper. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 2, p. 294–299, 2001.

HISCHIER, R.; ALTHAUS, H.-J.; WERNER, F. Developments in Wood and Packaging Materials Life Cycle Inventories in ecoinvent. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 10, n. 1, p. 50–58, 2005.

HONG, S., I.; LEE, J., W.; SON, S., M. Properties of polysaccharide-coated polypropylene films as affected by biopolymer and plasticizer types. **Packaging Technology and Science**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2005.

HOTCHKISS, J. H. Food packaging interactions influencing quality and safety. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, n. 6-7, p. 601–607, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 1ª ed. São Paulo, 1020 p., 2008.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. **Meat Science**, v. 54, n. 1, p. 49–57, 2000.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 4. ed. NewYork: Van Nostrand Reinhold, 1992. p. 701

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 712

JOHNSTON, J. H.; MORAES, J.; BORRMANN, T. Conducting polymers on paper fibres. **Synthetic Metals**, v. 153, n. 1-3, p. 65–68, 2005.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 26, n. 4, p. 973–980, 1998.

KAMEL, S. Rapid synthesis of antimicrobial paper under microwave irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1538–1542, 2012.

KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 563–576, 2009.

KE, S., HUANG, Y., DECKER, E. A., HULTIN, H. O. Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle. **Meat Science**, v. 82, n. 1, p. 113–118, 2009.

KERRY, J. P. New Packaging Technologies, Materials and Formats for Fast-Moving Consumer Products. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. Food Science and Technology. Second ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 549–584.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 113–130, 2006.

KHWALDIA, K. Water vapor barrier and mechanical properties of paper-sodium caseinate and paper-sodium caseinate-paraffin wax films. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 998–1013, 2010.

KHWALDIA, K., BASTA, A. H., ALOUI, H., EL-SAIED, H. Chitosan-caseinate bilayer coatings for paper packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 508–516, 2014.

KJELLGREN, H., GÄLLSTEDT, M., ENGSTRÖM, G., JÄRNSTRÖM, L. Barrier and surface properties of chitosan-coated greaseproof paper. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 4, p. 453–460, 2006.

KUORWEL, K. K., CRAN, M. J., SONNEVELD, K., MILTZ, J., BIGGER, S. W. Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 432–438, 2013.

LABSINTH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos - ácido cítrico anidro**. Diadema - SP, 2013.

LADEIRA, M. M., SANTAROSA, L. C., CHIZZOTTI, M. L., RAMOS, E. M., MACHADO NETO, O. R., OLIVEIRA, D. M., RIBEIRO, J. S. Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. **Meat science**, v. 96, n. 1, p. 597–605, 2014.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods,

new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244–282, 2007.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005, 384 p.

LAWRIE, R. A.; LEDWARD, D. A. **Lawrie's meat science**. Cambridge, England, 2006. 336p. 75–156

LEE, C. H., AN, D. S., LEE, S. C., PARK, H. J., LEE, D. S. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and alfa-tocopherol. **Journal of Food Engineering**, v. 62, n. 4, p. 323–329, 2004.

LEE, D. S. **Packaging containing natural antimicrobial or antioxidant agents**. Baltimore: Elsevier Science and Technology Books, 2005. p. 108–123

LIPPARELLI, C., MAHROUS, M., NACEUR, M., CRISTINA, M., ELIDA, R., BRETAS, S., BRAS, J. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 134–141, 2015.

LIU, F., DAI, R., ZHU, J., LI, X. Optimizing color and lipid stability of beef patties with a mixture design incorporating with tea catechins, carnosine, and alfa-tocopherol. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 2, p. 170–177, 2010.

LIU, K., XU, Y., LIN, X., CHEN, L., HUANG, L., CAO, S., LI, J. Synergistic effects of guanidine-grafted CMC on enhancing antimicrobial activity and dry strength of paper. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 382–387, 2014.

LIU, K., CHEN, L., HUANG, L., NI, Y., SUN, B. Enhancing antibacterium and strength of cellulosic paper by coating triclosan-loaded nanofibrillated cellulose (NFC). **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 996–1001, 2015.

LORENZO, J. M.; BATLLE, R.; GÓMEZ, M. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 181–188, 2014.

MACDOUGALL, D. B. Colour of meat. In: DUTSON, A. M. PEARSON, T. R. (Ed.). **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products. Advances in Meat Research Series, 9**. London, UK: Blackie Academic and Professional, 1994. p. 79–93.

MASCHERONI, E., GUILLARD, V., GASTALDI, E., GONTARD, N., CHALIER, P. Anti-microbial effectiveness of relative humidity-controlled carvacrol release from wheat gluten/montmorillonite coated papers. **Food Control**, v. 22, n. 10, p. 1582–1591, 2011.

MCKENNA, D. R., MIES, P. D., BAIRD, B. E., PFEIFFER, K. D., ELLEBRACHT, J. W., SAVELL, J. W. Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. **Meat Science**, v. 70, n. 4, p. 665–682, 2005.

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., TAUXE, R. V. Food-related illnesses and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607–625, 1999.

MITSUMOTO, M., O'GRADY, M. N., KERRY, J. P., JOE BUCKLEY, D. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, v. 69, n. 4, p. 773–779, 2005.

MOORE, M. E., HAN, I. Y., ACTON, J. C., OGALE, A., BARMORE, C. R., DAWSON, P. L. Effects of Antioxidants in Polyethylene Film on Fresh Beef Color. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 99–104, 2003.

MORAES, A. R. F. E, EDUARDO, L., GOUVEIA, R., FÁTIMA, N. DE, SOARES, F., MACIEL, M., CONCEIÇÃO, J. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 27, p. 33–36, 2007.

MOURAD, A. L.; GARCIA, E. E. C.; VILHENA, A. **Avaliação do ciclo de vida: princípios e aplicações**. Campinas-SP: CETEA/CEMPRE, 2002. p. 93

NAKAI, S. A.; SIEBERT, K. J. Organic acid inhibition models for *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Oenococcus oeni*. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 67–72, 2004.

NARAYAN, R.; BLOEMBERGEN, S.; LATHIA, A. **Method of preparing biodegradable modified-starch moldable products and films**. US Patent nº 5,869,647, 1999.

NASSAR, M. A.; YOUSSEF, A. M. Mechanical and antibacterial properties of recycled carton paper coated by PS/Ag nanocomposites for packaging. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 269–274, 2012.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard - Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8. Pennsylvania. v. 23, p. 1–58, 2003.

NERÍN, C., TOVAR, L., DJENANE, D., CAMO, J., SALAFRANCA, J., BELTRÁN, J. A., RONCALÉS, P. Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7840–7846, 2006.

NEWELL, D. G., KOOPMANS, M., VERHOEF, L., DUIZER, E., AIDARA-KANE, A., SPRONG, H., KRUSE, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. SUPPL. 1, p. 3–15, 2010.

NOLLET, L. M. L., BOYLSTON, T., CHEN, F., COGGINS, P., HYDLIG, G., MCKEE, L. H., KERTH, C. **Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality**. Wiley, 2012.

NORZIAH, M. H., AL-HASSAN, A., KHAIRULNIZAM, A. B., MORDI, M. N., NORITA, M. Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of

transglutaminase on gel properties. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1610–1616, 2009.

NOTERMANS, S.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and emerging foodborne diseases. **International journal of food microbiology**, v. 15, n. 3-4, p. 197–205, 1992.

NYCHAS, G. J. E., SKANDAMIS, P. N., TASSOU, C. C., KOUTSOUMANIS, K. P. Meat spoilage during distribution. **Meat science**, v. 78, n. 1-2, p. 77–89, jan. 2008.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SALMIÉRI, S., SAUCIER, L., LACROIX, M. Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 7, p. 5598–5605, 2004.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, p. 373–380, 2002.

RABINOVITCH, E. B. Effect of extrusion melt temperature on properties of flexible PVC. **Journal of Vinyl and Additive Technology**, v. 9, n. 2, p. 61–64, 2003.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 2182–2185, 1992.

REALINI, C.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat science**, v. 98, n. 3, p. 404–19, nov. 2014.

RHIM, J. W.; LEE, J. H.; HONG, S. I. Water resistance and mechanical properties of biopolymer (alginate and soy protein) coated paperboards. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 806–813, 2006.

RODRÍGUEZ, A.; BATLLE, R.; NERÍN, C. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. **Progress in Organic Coatings**, v. 60, n. 1, p. 33–38, 2007.

RODRÍGUEZ, A.; NERÍN, C.; BATLLE, R. New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6364–6369, 2008.

RODRIGUEZ-LAFUENTE, A.; NERIN, C.; BATLLE, R. Active paraffin-based paper packaging for extending the shelf life of cherry tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6780–6786, 2010.

RUDRA, S. G., SINGH, V., JYOTI, S. D., SHIVHARE, U. S. Mechanical properties and antimicrobial efficacy of active wrapping paper for primary packaging of fruits. **Food Bioscience**, v. 3, p. 49–58, 2013.

SANCHES-SILVA, A., COSTA, D., ALBUQUERQUE, T. G., BUONOCORE, G., COSTA, H. S. Trends in the use of antioxidants in active packaging. **5th International Symposium on Food Packaging**. Berlin, Germany, 2012.

SANTIAGO-SILVA, P., SOARES, N. F. F., NÓBREGA, J. E., JÚNIOR, M. A. W., BARBOSA, K. B. F., VOLP, A. C. P., WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA[®] 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 85–89, jan. 2009.

SANTOS, R. D. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em Biorreator**. 2005, 81 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Faculdade de Engenharia Química da Lorena, Lorena-SP.

SCHWAN, R. F.; DIAS, F. S.; LUIZA, C. *In situ* Inhibition of *Escherichia coli* Isolated from Fresh Pork Sausage by Organic Acids. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. 605–610, 2011.

SIRVIÖ, J. A., LIIMATAINEN, H., NIINIMÄKI, J., & HORMI, O. Sustainable packaging materials based on wood cellulose. **RSC Advances**, v. 3, n. 37, p. 16590, 2013.

SOARES, N. DE F. F., SILVA, W. A. DA, PIRES, A. C. DOS S., CAMILLOTO, G. P., SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 370–378, 2009.

SOFOS, J. **Advances in Microbial Food Safety**. Elsevier Science, 2013.

THERON, M. M.; LUES, J. F. R. **Organic Acids and Food Preservation**. Taylor & Francis, 2010. p. 340

TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, İ. D.; ÖZEN, B. Water vapor and oxygen-barrier performance of corn–zein coated polypropylene films. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 3, p. 342–347, 2010.

UCEDA, I. G. **Estabilidad del color de la carne de ternera**. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos. Universidad Pública de Navarra, 2010.

VARGAS JÚNIOR, A., FRONZA, N., FORALOSSO, F. B., DEZEN, D., HUBER, E., DOS SANTOS, J. H. Z., QUADRI, M. G. N. Biodegradable Duo-functional Active Film: Antioxidant and Antimicrobial Actions for the Conservation of Beef. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 75–87, 2015.

VARGAS JÚNIOR, A. **Blendas de Polietileno-Amido Duo-Funcionais: Ações Antioxidante e Antimicrobiana em Produto Carne**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

VARTAINEN, J., MOTION, R., KULONEN, H., RÄTTÖ, M., SKYTTÄ, E., AHVENAINEN, R. Chitosan-coated paper: Effects of nisin and different acids on the antimicrobial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, n. 3, p. 986–993, 2004.

VERMEIREN, L., DEVLIEGHERE, F., BEEST, M. VAN, KRUIJF, N. DE, DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 77–86, 1999.

WANG, Y., LIU, A., YE, R., WANG, W., LI, X. Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin – calcium carbonate composite films. **Food Chemistry**, v. 166, p. 414–422, 2015.

WELKER, C. A. D., BOTH, J. M. C., HAAS, S., LONGARAY, M. L. T. S. S. M., RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 8, n. 1, p. 44–48, 2010.

WENG, W.; ZHENG, H. Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate. **Food Chemistry**, v. 169, p. 255–260, 2015.

WRONA, M.; BENTAYEB, K.; NERÍN, C. A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Food Control**, v. 54, p. 200–207, 2015.

XI, J.; DU, W.; ZHONG, L. Probing the Interaction Between Cellulose and Cellulase with a Nanomechanical Sensor. **Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications**, p. 125–140, 2013.

ZHANG, W.; XIAO, H.; QIAN, L. Beeswax-chitosan emulsion coated paper with enhanced water vapor barrier efficiency. **Applied Surface Science**, v. 300, p. 80–85, 2014.

ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat - A review. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 119–128, 2010.