

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

FABIANA BORTOLINI FORALOSSO

**FILME ATIVO MULTIFUNCIONAL: AÇÕES ANTIESCURESCIMENTO E
ANTIMICROBIANA PARA CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS MINIMAMENTE
PROCESSADAS**

FLORIANÓPOLIS (SC)

2013

FABIANA BORTOLINI FORALOSSO

**FILME ATIVO MULTIFUNCIONAL: AÇÕES ANTIESCURESCIMENTO E
ANTIMICROBIANA PARA CONSERVAÇÃO DE MAÇÃS MINIMAMENTE
PROCESSADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri e Co-orientador: Prof. Dr. Nei Fronza.

FLORIANÓPOLIS (SC)

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e serenidade para vencer mais esta etapa da minha formação;

A toda a minha família, meu esposo Sedir, meu pai Antônio (*in memoriam*), a minha mãe Maria Luiza, minha avó Olga, minha irmã Luizabete, meu sobrinho Lucca, e demais familiares, por todo o amor, pela formação humana, pela inspiração, pela união, pela compreensão e paciência durante a realização deste trabalho;

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de formação científica.

À professora Mara Gabriela Novy Quadri pelo aprendizado, pela confiança, pelo incentivo, apoio e orientação neste trabalho;

Ao colega e co-orientador Nei Fronza, pelo incentivo, pelo apoio na realização deste trabalho e principalmente pela amizade;

Ao Instituto Federal Catarinense e Universidade do Contestado pelo suporte na realização deste trabalho;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através do professor João Henrique Z. dos Santos e da pesquisadora Larissa B. Capeletti, por todo o auxílio e aprendizado na realização deste trabalho;

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior do Estado de Santa Catarina, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho;

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

À Braskem pelo envio de amostra e à Plascon pela análise das propriedades mecânicas;

Aos meus colegas e amigos do Instituto Federal Catarinense: Alvaro, Carina, Cristiane, Eduardo, Giniani, Maria Manuela, Nei, Nelsi, Paulo, Sheila, Vanessa, Neiva pelo convívio, amizade e apoio ao longo desses anos;

Aos muito que tornaram possível a realização desse trabalho, especialmente aos colegas do IFC: Andréia, Eduardo, Cristiane, e do Laboratório de alimentos da UnC: Juliana, Paula, Sara e Marli, à colega Carina, pela amizade e apoio logístico na realização deste trabalho, muito obrigada;

Enfim, a todos os que me apoiaram minha gratidão e meu muito obrigado!

RESUMO

Diversas estratégias de conservação de vegetais minimamente processados (*VMP*) são empregadas, para a manutenção das características sensoriais e de qualidade, sendo destacado o uso de embalagens ativas, para retardar reações de escurecimento enzimático e microbiológicas. Neste contexto, foram elaborados filmes de Poli (cloreto de vinila) (PVC) com propriedades antiescurecimento e antimicrobianas, atribuídas pela adição de aditivo misto (*AM*) contendo metabissulfito de potássio puro (*MK*) e encapsulado (*MKE*) com o estudo do efeito sobre parâmetros de qualidade em maçãs minimamente processadas. O processo de encapsulação foi realizado pelo método *sol-gel* e os filmes de PVC obtidos por processo de extrusão industrial foram produzidos utilizando proporções de 0,1 % (p/p) (F01), 1,0 % (p/p) (F1) e 2,0 % (p/p) (F2) de *AM* (*MK* e *MKE*), além do filme controle (FC). O *MKE* foi química e morfologicamente caracterizado, bem como as propriedades mecânicas e térmicas dos filmes foram analisadas. Maçãs minimamente processadas foram elaboradas, acondicionadas nos filmes durante vinte dias de estocagem em diferentes temperaturas e a qualidade foi avaliada quanto às variações de cor, microbiológica e caracterização química. Os resultados mostraram o aumento da resistência térmica do aditivo para o *MKE*, sem interferir nas condições de processamento dos filmes. Parâmetros cinéticos mostraram que o aditivo puro apresentou ação inibitória, diminuindo as velocidades específicas de crescimento de *S. aureus* e *E. coli* e que o aditivo encapsulado é liberado gradativamente, apresentando uma redução de crescimento mais ao final do ciclo de crescimento dos micro-organismos. Não foram verificadas melhorias nas propriedades mecânicas dos filmes, já que a incorporação do aditivo diminuiu a resistência à tração, porém as propriedades térmicas foram preservadas. O índice de escurecimento das maçãs minimamente processadas foi menor para as amostras acondicionadas nos filmes F1 e F2 e o percentual de inibição nestes casos foi maior. O tratamento F2 promoveu a redução média de um ciclo log ao longo do período de estudo, comprovando o efeito inibitório do aditivo. Foi verificada a influência da temperatura nas velocidades de degradação enzimática e microbiológica, através dos cálculos da energia de ativação, com efeito inibitório superior quando foi avaliado o filme F2, onde as reações foram mais lentas. Os índices de qualidade revelaram que a perda de massa das amostras foi afetada pelos filmes com maior concentração do aditivo, nas temperaturas mais altas e ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados mostraram efeito satisfatório na manutenção de cor e qualidade microbiológica bem como segurança toxicológica das maçãs minimamente processadas se mantidas até 12 dias à 8 °C utilizando o filme F2, o que resultou em aumento na vida de prateleira do alimento. Sendo assim, pode-se afirmar que os filmes ativos multifuncionais são uma boa alternativa para a conservação de maçãs minimamente processadas.

Palavras chave: Embalagem ativa, Encapsulação, SO₂ residual; Maçãs minimamente processadas; Antiescurecimento; Antimicrobiano.

ABSTRACT

Several conservation strategies for minimally processed vegetables (*MPV*) are employed to maintain the sensorial characteristics and quality, and emphasizing the use of active packaging, to slow enzymatic browning and microbiological reactions. In this context, Poly Vinyl Chloride films (PVC) were prepared with antimicrobial and antibrowning properties, attributed to the addition of a mixed additive (*MA*) containing pure (*MK*) and encapsulated (*MKE*) potassium metabisulfite and study its effect on quality parameters in minimally processed apples. The encapsulation process was performed by the *sol-gel* method and the PVC films were produced using proportions of 0.1% (w/w) (F01), 1.0% (w/w) (F1) and 2.0% (w/w) (F2) of *MA* (*MK* and *MKE*), besides the control film (FC) for industrial extrusion process. The *MKE* was chemically and morphologically characterized, and the mechanical and thermal properties of the films were analyzed. Minimally processed apples were prepared and packed in films for twenty days of storage at different temperatures and the quality was evaluated for changes in color, microbiological and chemical characterization. The results showed increased thermal resistance of the *MKE*, preserving the original characteristics without interfering on processing conditions of the films. Kinetic parameters showed that the pure additive showed inhibitory action, decreasing the specific growth rates of *S. aureus* and *E. coli* and that the encapsulated additive is released gradually, showing a reduction of growth towards the end of the cycle. No improvements were observed in the mechanical properties of the films, since the incorporation of the additive decreased the tensile strength, but the thermal properties were preserved. The rate of browning of minimally processed apples was lower for samples packaged in F1 and F2 films and the percentage of inhibition was greater in these cases. The F2 treatment caused a reduction of an average log cycle over the period of study, demonstrating the inhibitory effect of the additive. The influence of temperature on microbial and enzymatic degradation rates was verified through calculations of the activation energy, with higher inhibitory effect when the F2 film was evaluated, where the reactions were slower. The quality scores revealed that the mass loss of the samples was affected by the films with a higher concentration of the additive at higher temperatures and over storage time. The results therefore showed satisfactory effect on maintaining color and microbiological and toxicological safety of minimally processed apples kept during 12 days at 8 ° C using the F2 film, resulting in increased shelf life of the food. Thus, one can say that movies multifunctional assets are a good alternative for the conservation of minimally processed apples.

Kew words: Active package; Encapsulation, residual SO₂; Minimally processed apples; Antibrowning; Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de oxidação do fenol a catecol e à <i>orto</i> -quinona pela ação da enzima polifenoloxidase (<i>PPO</i>).....	23
Figura 2 - Estrutura química do Poli (cloreto de vinila) (<i>PVC</i>).....	28
Figura 3 - Mecanismo de ação do sulfito, bloqueando a reação de polimerização através da formação das sulfoquininas.....	35
Figura 4 - Esquema da dissociação do <i>MBSK</i> em meio aquoso.....	37
Figura 5 - Etapas do processo de síntese de matriz encapsulada em sílica.....	44
Figura 6 - Fluxograma esquemático da abordagem ao estudo da aplicação de embalagem contendo agente ativo em vegetais minimamente processados.....	48
Figura 7 - Esquema geral da síntese via encapsulamento por processo <i>sol-gel</i>	52
Figura 8 - Estudo da cinética microbiana <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>SA</i>) através da densidade óptica por <i>ELISA</i>	55
Figura 9 - Mecanismo da ação oligodinâmica entre o mercúrio - Hg e enzimas de microorganismos, à similaridade dos íons sulfitos.....	64
Figura 10 - Resultados dos testes de inativação microbiana qualitativa para o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Incubação (a): sem presença de aditivo e (b): com presença do aditivo (<i>MBSK</i> 300 mg.kg ⁻¹).....	65
Figura 11 - Resultados dos testes de inativação microbiana qualitativa para o crescimento de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9950. Incubação (a): sem presença de aditivo; (b) com presença do aditivo (<i>MBSK</i> 300 mg.kg ⁻¹).....	67
Figura 12 - Atividade enzimática da polifenoloxidase (<i>PPO</i>) dos extratos testados durante reação de escurecimento enzimático.....	68
Figura 13 - Curvas termogravimétricas (<i>TGA</i>) e derivadas das curvas termogravimétricas (<i>DTG</i>) dos aditivos <i>MK</i> (a) e <i>MKE</i> (b).....	70
Figura 14 - (a) Espectro da dispersão de energia <i>EDX</i> do aditivo encapsulado, considerando a contagem de fótons que chega ao detector em relação ao kiloeletrovolt; (b) composição dos elementos encontrados por <i>EDX</i> para o <i>MKE</i> ; (c) resultados da análise morfológica de superfície do aditivo <i>MKE</i> e (d) espectro de <i>DRS</i> no UV-vis (200-500 nm) do <i>MK</i> , <i>MKE</i> em sílica e da sílica pura com ligante aminopropil (<i>Si-NH₂</i>).....	73
Figura 15 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana do aditivo puro e encapsulado com ligante aminopropil. Na primeira linha (a) os resultados para <i>S. aureus</i> , sendo da esquerda para a direita respectivamente: Controle positivo, <i>MK</i> (aditivo puro); <i>AM</i> (aditivo misto: puro + encapsulado <i>Si-NH₂</i>); <i>MKE</i> (aditivo encapsulado). Na segunda linha (b) os mesmos resultados tratamentos, para <i>E. coli</i>	75
Figura 16 - (a) Curvas de crescimento com representação semilogarítmica da ação de <i>MBSK</i> puro, encapsulado em suporte aminopropil e misto (50% puro e 50% encapsulado) sobre <i>S. aureus</i> em função do tempo de cultivo. Média de três repetições. (b) Curvas de crescimento nas mesmas condições sobre <i>E. coli</i>	77
Figura 17 - Perda de massa (a) e Derivada da temperatura de degradação máxima dos filmes ativos (b), onde: <i>FC</i> = filme controle; <i>F01</i> = filme contendo 0,1% do aditivo, <i>F1</i> = filme 1% de aditivo e <i>F2</i> = filme contendo 2% de aditivo, obtidos na análise de <i>TGA</i>	80
Figura 18 - Perfil dos elementos que compõe o filme <i>F01</i> (a), <i>F1</i> (b) e <i>F2</i> (c), obtidos na análise de <i>MEV-EDX</i> por separação de energia de raio X e resultados da análise morfológica da superfície obtida em imagens de <i>MEV</i>	85
Figura 19 - Valores de <i>L*</i> para maçãs minimamente processadas acondicionadas nos filmes	

ativos em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	87
Figura 20 - Valores de a^* para maçãs minimamente processadas acondicionadas nos filmes ativos em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	89
Figura 21 - Valores de b^* para maçãs minimamente processadas acondicionadas nos filmes ativos em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	90
Figura 22 - Resultados da diferença de cor de maçãs minimamente processadas entre os tratamentos nas temperaturas e tempos de armazenamento.....	92
Figura 23 - Valores de cor RGB em maçãs minimamente processadas entre os tratamentos nas temperaturas e tempos de armazenamento.....	93
Figura 24 - Resultados do efeito antiescurecimento de filmes controle (FC) e filmes ativos F01 (0.1%), F1 (1.0%) e F2 (2.0%) armazenados a 4 ° C após 16 dias de estocagem.....	94
Figura 25 - Superfícies de respostas para o parâmetro IE em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	96
Figura 26 - Superfícies de respostas para o parâmetro número de sobreviventes ($\log UFC.g^{-1}$) em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	101
Figura 27 - Parâmetros cinéticos e gráfico de Arrhenius do índice de escurecimento em função do tempo e temperatura de estocagem.....	106
Figura 28 - Parâmetros cinéticos e gráfico de Arrhenius do número de sobreviventes em função do tempo e temperatura de estocagem.....	107
Figura 29 - Superfícies de respostas para o parâmetro perda de massa (PM) em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	110
Figura 30 - Superfícies de respostas para o parâmetro pH em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	112
Figura 31 - Superfícies de respostas para o parâmetro resíduo de SO_2 ($mg.kg^{-1}$) em função do tempo e temperatura de armazenamento.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fórmulas químicas, rendimento teórico de SO ₂ e respectivos números de identificação internacional dos agentes sulfitantes.....	36
Tabela 2 - Alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados com a função de conservadores e seus respectivos limites máximos.....	39
Tabela 3 - Resultados dos antibiogramas de bactérias Gram positivas e Gram negativas de importância em alimentos contra <i>MBSK</i>	63
Tabela 4 - Resultados de antibiogramas de fungos de importância em alimentos contra <i>MBSK</i>	67
Tabela 5 - Temperatura na qual a taxa de degradação é máxima (T _{max}), obtida pela análise de DTG e percentual de perda de massa referente à T _{max}	71
Tabela 6 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana (zonas de inibição) do aditivo para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> em diferentes tratamentos.....	76
Tabela 7 - Resultados da cinética de crescimento de <i>S. aureus</i> incluindo as curvas ajustadas da equação da reta, velocidade específica máxima e tempo de geração para avaliar o efeito dos diferentes aditivos sobre o crescimento do micro-organismo.....	78
Tabela 8 - Resultados da cinética de crescimento de <i>E. coli</i> incluindo as curvas ajustadas com a equação da reta, velocidade específica máxima e tempo de geração para avaliar o efeito dos diferentes aditivos sobre o crescimento do micro-organismo.....	79
Tabela 9 - Temperatura na qual a faixa de degradação é máxima (T _{max}), perda de massa em relação à massa inicial das amostras de filmes FC, F01, F1 e F2, em diferentes estágios de degradação térmica e massa residual ao final da análise.....	82
Tabela 10 - Espessura dos filmes de e ensaios de tração DM (direção da máquina) e DT (direção transversal) para os filmes ativos e controle.....	83
Tabela 11 - Resultados do percentual de inibição do escurecimento enzimático dos filmes ativos F01, F1 e F2 contra maçãs minimamente processadas nas condições de estocagem.....	97
Tabela 12 - Enumeração da população microbiana (log UFC.g ⁻¹) em maçãs minimamente processadas.....	102
Tabela 13 - Parâmetros cinéticos de Energia de ativação (<i>Ea</i>) e Coeficiente de determinação (<i>R</i>) para efeito antiescurecimento e antimicrobiano em maçãs minimamente processadas.....	108
Tabela 14. Mapeamento dos valores de contaminação microbiológica (contagem de psocrotróficos) e química (residual de SO ₂), considerando, respectivamente, os limites de 6 log UFC.g ⁻¹ e 10 mg.kg ⁻¹ . Os filmes destacados em vermelho indicam os valores que excederam os limites da legislação.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

Aw – Atividade de água

AM - Aditivo misto

DM – Direção máquina

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

DT – Direção transversal

Ea - Energia de ativação

EC- *Escherichia coli*

EDX - Espectroscopia de emissão de raios-X por dispersão em energia

IE – Índice de escurecimento

MBSK - Metabissulfito de potássio

MK - Metabissulfito de potássio puro

MKE - Metabissulfito de potássio encapsulado

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

PVC - Poli (cloreto de vinila)

PPO - Polifenoloxidase

SA – *Staphylococcus aureus*

SAXS – Espectroscopia de espalhamento de raios-X em baixo ângulo

Si-NH₂ - Sílica-aminopropil

TEOS - Tetraetilortosilano

TGA - Análise termogravimétrica

UFC.g⁻¹ – Unidade formadora de colônias por grama de amostra

UV - Radiação ultra-violeta

VMP - Vegetais minimamente processados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 PROCESSAMENTO MÍNIMO DE VEGETAIS – CONSIDERAÇÕES E ASPECTOS GERAIS DO TEMA.....	18
3.2 ALTERAÇÕES EM VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS	20
3.2.1 Alterações enzimáticas	20
3.2.1.1 Enzimas envolvidas no escurecimento.....	21
3.2.1.2 Mecanismo de ação enzimática da <i>PPO</i> – reação de oxidação.....	22
3.2.2 Alterações microbiológicas.....	24
3.2.3 Parâmetros higiênico-sanitários de controle para <i>VMP</i>	24
3.3 SISTEMAS DE ACONDICIONAMENTO PARA A CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL.....	26
3.3.1 O Poli (cloreto de vinila) (PVC) como material de embalagem.....	28
3.4 EMBALAGENS ATIVAS APLICADAS EM ALIMENTOS.....	29
3.4.1 Aspectos a considerar no desenvolvimento de filmes ativos.....	31
3.5 ADITIVOS APLICADOS EM POLÍMEROS DESTINADOS AO ACONDICIONAMENTO DE ALIMENTOS.....	33
3.5.1 Agentes sulfitantes.....	34
3.5.2 Migração do agente da embalagens para o alimento.....	39
3.6 PROCESSOS DE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS.....	40
3.6.1 Método sol-gel.....	42
3.7 LEGISLAÇÃO PARA EMBALAGENS ATIVAS.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 ASPECTOS GERAIS.....	47
4.2. ESCOLHA DO ADITIVO ANTIOXIDANTE/ANTIMICROBIANO.....	48
4.3 DETALHAMENTO DAS METAS PROPOSTAS.....	49
4.3.1 Detecção da atividade antimicrobiana– método de difusão em disco.....	49
4.3.2 Estudo do Potencial do <i>MBSK</i> na inibição da atividade da enzima de escurecimento (Polifenoloxidase –<i>PPO</i>).....	50
4.3.3 Obtenção do aditivo <i>MBSK</i> encapsulado via método <i>sol-gel</i>.....	51
4.3.4 Caracterização do aditivo encapsulado.....	53
4.3.5 Avaliação do potencial antimicrobiano do aditivo encapsulado.....	54
4.3.6 Produção de filmes ativos de PVC com <i>MBSK</i> encapsulado.....	56

4.3.6.1	Fabricação dos filmes ativos de PVC.....	56
4.3.7	Caracterização das propriedades dos filmes ativos produzidos.....	56
4.3.7.1	Composição química e morfológica dos filmes.....	56
4.3.7.2	Aspecto visual.....	57
4.3.7.3	Medida de espessura e propriedades mecânicas dos filmes.....	57
4.3.8	Preparo das maçãs minimamente processadas, envolvimento nos filmes ativos e acompanhamento da vida de prateleira.....	58
4.3.9	Avaliação de parâmetros de cor dos vegetais ao longo do tempo de estocagem.....	59
4.3.10	Contagem de micro-organismos psicrotróficos.....	60
4.3.11	Cálculo da energia de ativação (<i>E_a</i>) sobre os parâmetros de reação de escurecimento enzimático e da contaminação microbiológica, nas condições de armazenamento.....	60
4.3.12	Determinação de índices de qualidade dos VMP após acondicionamento nos filmes.....	61
4.3.13	Detecção da contaminação do alimento por resíduo de sulfitos	62
4.3.14	Análise Estatística.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO IN VITRO DO ADITIVO.....	63
5.2	RESULTADOS DO EFEITO DO <i>MBSK</i> NA INIBIÇÃO DA ENZIMA <i>PPO</i>	68
5.3	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ADITIVO <i>MBSK</i> ANTIOXIDANTE/ANTIMICROBIANO ENCAPSULADO COM DIFERENTES ELEMENTOS LIGANTES	69
5.3.1	Resultados das análises termogravimétricas para o aditivo puro (<i>MK</i>) e encapsulado (<i>MKE</i>) com aminopropil.....	69
5.3.2	Resultados das análises de SAXS.....	71
5.3.3	Resultados da análise de MEV-EDX do <i>MKE</i> e espectro de DRS na região UV-visível.	72
5.4	ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA O ADITIVO ENCAPSULADO (<i>MKE</i>) COM DIFERENTES ELEMENTOS LIGANTES SOBRE MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA EM VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS (<i>VMP</i>).....	74
5.5	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E QUÍMICAS DOS FILMES ELABORADOS.....	79
5.5.1	Resultados das análises térmicas dos filmes.....	79
5.5.2	Medida de espessura e propriedades mecânicas dos filmes.....	82
5.5.3	Resultados dos perfis dos elementos químicos presentes e avaliação microscópica dos filmes.....	84
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIESCURECIMENTO.....	86
5.6.1	Parâmetros de cor <i>L*</i>, <i>a*</i> <i>b*</i>.....	86
5.6.2	Diferença de cor.....	91
5.6.3	Índice de escurecimento (<i>IE</i>).....	94
5.6.4	Percentual de inibição do escurecimento.....	97

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO.....	98
5.8 ENERGIA DE ATIVAÇÃO (<i>E_a</i>) SOBRE O EFEITO ANTIESCURECIMENTO E ANTIMICROBIANO.....	104
5.9 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE QUALIDADE.....	109
5.9.1 Perda de massa.....	109
5.9.2 pH.....	111
5.9.3 Contaminação microbiológica.....	113
5.9.4 Resíduo de SO ₂	113
5.9.5 Avaliação da vida-de-prateleira.....	115
6 CONCLUSÕES.....	118
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	120
REFERÊNCIAS.....	121
APÊNDICES.....	135

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos tem sido uma das maiores exigências dos consumidores, através da busca por produtos menos industrializados com poucos conservantes, com características de “frescor”, que sejam seguros e de fácil preparo. Entretanto, os consumidores desejam associar tais atributos a valores nutricionais adequados às necessidades humanas e as propriedades funcionais.

Essas exigências relacionadas com a conveniência, qualidade e praticidade têm modificado os padrões de consumo, além de aumentar os desafios para as agroindústrias. Com isso, novas tecnologias e materiais estão sendo desenvolvidos com o objetivo de manter a qualidade dos alimentos associado às questões de segurança alimentar, estendendo-lhes a vida útil.

Neste sentido, os vegetais minimamente processados (*VMP*) apresentam-se como uma boa alternativa uma vez que atendem à facilidade de consumo e podem fornecer os nutrientes essenciais à dieta humana, colaborando na prevenção de diversas doenças (SON et al., 2001; CALEB et al., 2012). Adicionalmente, a expansão da indústria de processamento de frutas e vegetais impulsiona o consumo destes produtos, trazendo contribuição econômica ao Brasil. Uma das alternativas de consumo prático e saudável, são as maçãs fatiadas, que podem ser servidas, como lanche especialmente ao público infantil, em viagens, em restaurantes, em supermercados, para consumo direto ou adicionados em sobremesas, saladas, sorvetes, bem como outros produtos.

Apesar das vantagens apresentadas por estes produtos, a comercialização de *VMP* traz implicações referentes à manutenção das características sensoriais e de qualidade. Assim, o desafio está relacionado com a qualidade e o aumento do período de vida útil. Durante a estocagem, estes produtos sofrem alterações, que são influenciadas pelo processamento e armazenamento, tornando-se mais perecíveis do que os produtos *in natura*.

O controle do escurecimento enzimático e o controle de micro-organismos são os dois grandes desafios para a garantia da qualidade e conservação desses produtos. Métodos mais eficazes devem ser desenvolvidos simultaneamente para controlar tanto reações de escurecimento enzimático (oxidação dos compostos fenólicos catalisados por enzimas oxidases) (LUO et al., 2011; KHADEMI et al., 2012; TURKYLMAZ et al., 2012) quanto reações microbiológicas, através

de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (RAGAERT et al, 2007; LUO et al., 2011; MURIEL-GALET et al., 2012), o que limita a comercialização dos mesmos em poucos dias.

Diversas estratégias podem ser empregadas para o controle do crescimento microbiano e das reações de oxidação. Na última década pode ser destacada a técnica auxiliar de conservação por acondicionamento em embalagens ativas. Estas liberam, para a superfície na qual estão em contato, quantidades de uma ou mais substâncias capazes de inibir e/ou diminuir uma reação ou processo indesejável específico, com a finalidade de aumentar a vida de prateleira do alimento em questão (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Estima-se que parte da produção brasileira de frutas e hortaliças é perdida no transporte, estocagem e comercialização, e pela ausência de embalagens adequadas (FERNANDES, 2001). Neste sentido, as embalagens podem minimizar as reações deteriorativas dos problemas decorrentes do processamento mínimo. Embalagens ativas têm sido utilizadas em uma variedade de produtos que apresentam diferentes mecanismos de deterioração, sendo necessário o conhecimento das reações de alteração para que se possa selecionar o material mais adequado para cada situação de aplicação (SARANTOPOULOS; MORAES, 2009).

Muitas substâncias têm sido incorporadas a embalagens para torná-las ativas, porém poucas são eficazes no controle microbiológico simultaneamente à inibição do escurecimento enzimático. Um ativo multifuncional com propriedades antiescurecimento (LU et al., 2007; FAN et al., 2009; XING et al., 2011) e antimicrobiana (USSEGLIO-TOMASSET, 1992; MACHADO et al., 2006) é o dióxido de enxofre (SO_2) e seus sais inorgânicos, os quais liberam gás permitindo que atue tanto na superfície como no interior do produto.

Entretanto, alguns estudos mostram que o teor residual de SO_2 oriundo da dissociação instantânea dos sais utilizados como aditivos podem causar efeitos adversos à saúde humana (MENG et al., 2008; FAN et al., 2009; XING et al., 2011) e, por isso, muitos países tem estabelecidos limites residuais de sulfitos em diferentes tipos de alimentos.

Neste contexto, a aplicação da técnica de encapsulação via *sol-gel* ao SO_2 para a incorporação do material encapsulado à embalagens apresenta-se como uma alternativa. Os sistemas encapsulados são capazes de proteger e/ou controlar um grupo funcional ativo, como por exemplo o SO_2 , de interações com componentes que não sejam de interesse, tornando-os mais

reativos. Sendo assim, a liberação seletiva e controlada de SO_2 oriunda deste sistema de embalagem, pode otimizar o efeito antiescurecimento/antimicrobiano e adicionalmente controlar a formação do SO_2 residual (XING et al., 2011) em uma ampla variedade de produtos durante o armazenamento prolongado, reduzindo o excesso de aditivos sobre os alimentos.

Desta forma, os sulfitos, incluindo o metabissulfito de potássio (*MBSK*), podem ser incorporados aos filmes poliméricos extrusados para contato com vegetais, a fim de evitar escurecimento enzimático e inibir a deterioração causada por micro-organismos e, conseqüentemente, propiciando um maior tempo de armazenamento dos produtos. Por ser uma técnica promissora para a conservação de alimentos, com perspectivas de interesse industrial, faz-se necessária a realização de pesquisas para o desenvolvimento de filmes poliméricos com propriedades ativas para aplicação em *VMP*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter um filme ativo de Poli (cloreto de vinila) (PVC) com propriedades antiescurecimento e antimicrobianas pela adição de aditivo misto contendo metabissulfito de potássio (puro e encapsulado), e estudar seu efeito sobre parâmetros de qualidade de maçãs minimamente processadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o potencial antimicrobiano e antiescurecimento *in vitro* do aditivo *MBSK* em maçãs minimamente processadas;
- b) Obter o aditivo *MBSK* encapsulado com diferentes radicais ligantes;
- c) Testar o potencial antimicrobiano do *MBSK* encapsulado com diferentes radicais ligantes sobre micro-organismos de importância em vegetais minimamente processados (*VMP*);
- d) Selecionar a aditivo encapsulado com melhor desempenho e determinar suas propriedades físico-químicas;
- e) Produzir filmes ativos de PVC com aditivo misto (metabissulfito de potássio puro (*MK*) e encapsulado (*MKE*) de melhor desempenho), via extrusão industrial;
- f) Determinar as propriedades mecânicas, térmicas e morfológicas dos filmes obtidos;
- g) Avaliar o efeito antiescurecimento e antimicrobiano dos filmes durante a vida de prateleira das maçãs minimamente processadas em condições comerciais de armazenamento;

- h) Estudar possíveis alterações nos índices de qualidade do alimento nas condições de armazenamento;
- i) Avaliar a influência da temperatura sobre as velocidades das reações de degradação enzimática e microbiológica, nas diferentes condições de armazenamento;
- j) Estimar o aumento da vida de prateleira das maçãs minimamente processadas acondicionadas em cada sistema de embalagem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta os aspectos teóricos encontrados na literatura que servem de fundamento às aplicações, às análises, ao desenvolvimento e às discussões dos resultados apresentados neste trabalho. Subdividida em sete itens, esta revisão aborda o processamento mínimo de vegetais, as alterações de origem biológica, o sistema de acondicionamento dos produtos, as embalagens ativas, os agentes químicos para aplicação em embalagens ativas, o processo de encapsulação e a legislação aplicada a embalagens ativas.

3.1 PROCESSAMENTO MINIMO DE VEGETAIS – CONSIDERAÇÕES E ASPECTOS GERAIS DO TEMA

No mercado hortifrutícola, tradicionalmente, os produtos eram oferecidos ao consumidor desprovidos de embalagem ou de qualquer tratamento, sem denominações de origem ou indicações do modo de produção, passaram, nos últimos anos, por alterações profundas, das quais se destacam os vegetais minimamente processados (*VMP*) (GIL, 2008).

Os *VMP* estão entre os produtos de grande consumo e a demanda aumentou, tendo em vista o desejo do consumidor por alimentos com características próximas ao *in natura*, além da praticidade e conveniência por estes ofertados (LU et al., 2007; JUNQUEIRA, 2008; JUNQUEIRA et al., 2009), alto valor nutritivo (RICO et al., 2007; MURIEL-GALET et al., 2012) (com redução no tempo de preparo, maior padronização (TRESSELER et al., 2009) e redução do desperdício (MAISTRO, 2001).

Os *VMP* são também denominados "fresh-cut", por sofrerem leve modificação nas características originais, mantendo o frescor e a qualidade (ENDO et al., 2006). A definição destes produtos 'pré-cortados' é segundo a IFPA (*International Fresh-Cut Produce Association*) (2001): 'qualquer fruto ou hortaliça ou combinação destes, cuja forma original foi fisicamente alterada, mantendo-se, entretanto no estado fresco' (ALZAMORA et al., 1998; FERNANDES, et al., 2010). Assim, o processamento mínimo envolve a manipulação, o preparo, embalagem e a distribuição de produtos agrícolas, através de procedimentos como seleção, lavagem, descascamento, corte e

classificação, que não afetem suas características sensoriais, agregando valor aos mesmos (FERNANDES, et al., 2010; KARAGOZLU et al., 2011).

Por se tratar de produtos fisicamente alterados, são altamente perecíveis e podem sofrer ação microbiológica, enzimática ou não enzimática, em função da composição (CAHAN, et al., 2002), necessitando de cuidados especiais e adoção de estratégias para o aumento da sua vida de prateleira (ARTÉS et al., 2007).

Uma vez que não existem estratégias para completa eliminação dos micro-organismos patogênicos em produtos frescos sem afetar a qualidade (LOPEZ-GALVEZ et al., 2010) e que a comercialização desses produtos tem crescido acentuadamente, o número de surtos de contaminação microbiológica tem aumentado significativamente (RICO et al., 2007; MURIEL-GALET et al., 2012). Isso ocorre especialmente pelas operações do processamento que podem levar a contaminação cruzada, em que até mesmo uma pequena parte afetada pode ser responsável pela contaminação de todo o alimento, podendo alterar a qualidade e segurança dos produtos frescos e causar a transmissão de importantes doenças (MURIEL-GALET et al., 2012).

Em consequência do processamento, ocorre o rompimento das células e o contato entre enzima e substrato, no qual as reações enzimáticas provocam mudanças de cor, textura, aroma, podem ativar o desenvolvimento microbiano e maturação climatérica (LU et al., 2007; YOSHIDA; ANTUNES, 2009) sendo acentuadas pelas condições inadequadas de armazenamento, transporte e distribuição (ARTÉS et al., 1998).

Pela ação das enzimas e micro-organismos deteriorantes e patogênicos, a vida útil dos *VMP* é limitada após o processamento (DEL NOBILE et al., 2008), em não mais que 8 dias, quando armazenado em condições adequadas (ALLENDE; ARTÉS, 2003). Apesar disso, o processamento mínimo tem evoluído e inclui uma ampla variedade de métodos e tecnologias para preservação (ALZAMORA et al., 1998) no sentido de minimizar alterações e aumentar a vida de prateleira, envolvendo diversos fatores: o controle da temperatura, juntamente com a umidade, a remoção de oxigênio e o uso de embalagens efetivas (RESTUCCIA et al., 2010).

O controle do escurecimento na superfície de corte e o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis constituem os pontos críticos desta tecnologia, para a manutenção da qualidade e segurança desses produtos. A incompatibilidade entre o uso de inibidores de

escurecimento e tratamentos antimicrobianos convencionais representa desafios para a indústria de alimentos (LU et al., 2007), bem como as condições de armazenamento que ainda precisam ser largamente exploradas para melhor manter seus atributos de qualidade e frescor (ROJAS-GRAU et al., 2009).

Segundo Sarantópoulos et al. (2001), é de grande importância o desenvolvimento de embalagens adequadas para estes produtos, em razão das injúrias mecânicas sofridas durante o processamento provocam um aumento no metabolismo do vegetal, aumentando a taxa respiratória, a atividade enzimática e o desenvolvimento microbiano. Assim, para preservar as características de frescor dos *VMP* de maneira efetiva e reprodutiva, muitos estudos são necessários, devido à diversidade de matérias primas, formas, aspectos de qualidade, características fisiológicas e variação na distribuição e comercialização (RICO et al., 2007).

3.2 ALTERAÇÕES EM VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS

Os alimentos são industrializados para manutenção da qualidade, porém, podem sofrer alterações indesejáveis, principalmente sob os aspectos de ordem química e/ou enzimática, e aquelas de ordem microbiológica (FRANCO; LANDGRAF, 2005; FRONZA, 2009).

3.2.1 Alterações enzimáticas

Dentre os atributos sensoriais, a aparência, que é significativamente influenciada pela cor, é um dos primeiros critérios utilizados pelos consumidores para a aquisição do produto (RICO et al., 2007). Quanto à coloração de frutas e hortaliças, estas usualmente sofrem alterações indesejáveis devido à ação enzimática (ENDO et al., 2006). Esta reação, em geral, ocorre rápida e intensamente e consiste na oxidação de compostos fenólicos à quinonas pela ação de uma ou múltiplas enzimas (ARTÉS et al., 1998), tornando-os escuros e com aspecto indesejável. Estes pigmentos escuros formados são acompanhados de alterações na aparência, nas propriedades sensoriais (alterações de cor, aroma, textura) no valor nutritivo do produto (MA, 1992; ARTÉS et al., 1998), na taxa respiratória e evolução de etileno (AHVENAINEN, 1996; CHITARRA, 2002; ARAÚJO, 2008), resultando na diminuição da sua vida útil e do seu valor de mercado (MA, 1992).

Sob o aspecto nutricional, o problema do escurecimento enzimático deve-se à possibilidade das quinonas interagirem com grupos amina e tiol, reduzindo a disponibilidade da lisina, metionina, tiamina e outros nutrientes (ARAÚJO, 2008).

O escurecimento da superfície de corte é, portanto, um dos maiores obstáculos para o comércio de frutas frescas, sendo um dos principais problemas da redução da vida útil de *VMP* (MA et al., 1992; THÉ et al., 2006). A presença de O₂, o armazenamento prolongado, a umidade relativa baixa, altas temperaturas, ou injúria pelo frio, podem potencializar o escurecimento (OMS-OLIU et al., 2008).

3.2.1.1 Enzimas envolvidas no escurecimento

Dentre as principais enzimas relacionadas à alteração da cor nos *VMP* está o grupo das polifenoloxidasas (*PPO*) (WHITAKER; LEE, 1995; THÉ et al., 2006) e o grupo das peroxidases (*POD*) (LOPES; CLEMENTE, 2002; PINELLI et al., 2005) que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, produzindo pigmentos escuros em cortes ou superfícies danificadas de frutas e hortaliças (SIMÕES, 2004).

As alterações causadas pelas enzimas são modificações desejáveis em alguns produtos, como por exemplo, para o chá preto e o café e indesejáveis no caso do escurecimento de outros produtos como as frutas e hortaliças, sendo uma das mais importantes causas da perda de qualidade desses produtos (ARTÉS et al., 2007; LOPEZ-NICOLÁS, 2007 QUEVEDO et al., 2009), que devem ser controlados sem que ocorram prejuízos (GARCIA; BARRET, 2002; OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

A *POD* contém um grupo *heme* e está relacionada com processos de cicatrização, como por exemplo, a lignificação (CANTOS et al., 2002). A *PPO*, também conhecida como catecoloxidase, catecolase, oxidase difenol, *o*-difenolase, fenolase e tironase é encontrada na maioria dos vegetais, sendo que a localização da enzima na célula vegetal depende da espécie, desenvolvimento e grau de maturidade (ESKIN, 1991).

Entre os principais fatores determinantes para a reação de escurecimento estão a concentração da enzima e dos compostos fenólicos, pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio (MARTINEZ; WHITAKER, 1995), que podem ser modificados por métodos baseados na

inativação pelo calor, remoção ou transformação dos substratos (oxigênio e fenóis), redução do pH e adição de antioxidantes (MARTINEZ; WHITAKER, 1995; AZEREDO, 2000; MARSHAL; KIM; WEI, 2000), mas como não se aplica tratamento térmico aos *VMP*, não é possível inativar essas enzimas por desnaturação térmica (ARTÉS et al., 1998).

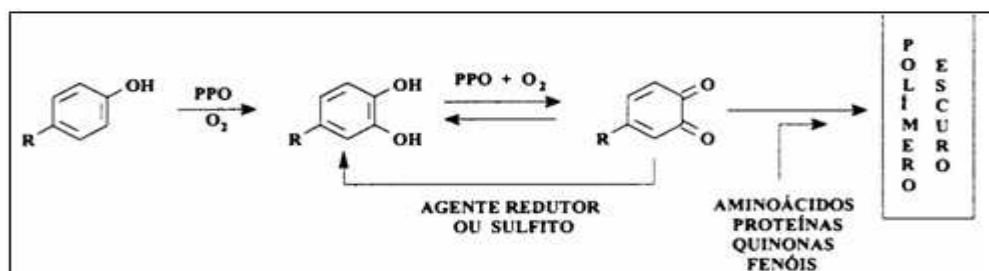
3.2.1.2 Mecanismo de ação enzimática da *PPO* – reação de oxidação

Apesar do mecanismo de formação de pigmentos a partir de substratos fenólicos não ser completamente conhecido, há indicação de que a *PPO* inicia o processo de escurecimento através da promoção da oxidação e desidrogenação destes compostos fenólicos, quando do corte dos vegetais, na presença do oxigênio molecular em condições apropriadas de pH, temperatura e atividade de água (ARTÉS et al., 2007). O produto inicial da oxidação, a *orto*-quinona, rapidamente sofre polimerização, formando pigmentos escuros insolúveis, as melaninas, ou reage não enzimaticamente com outros compostos fenólicos, aminoácidos e proteínas, formando também melanina (MARTINEZ; WHITAKER, 1995; ARTÉS et al., 1998; ARAÚJO, 2008).

Mesmo que muitos compostos antiescurecimento inibam a atividade da *PPO*, somente um número limitado de aditivos é aceito, visto que sua escolha é baseada na segurança e no custo para o controle do escurecimento durante o processamento, entre os quais estão os agentes redutores (sulfitos, ácido ascórbico, ácido eritórbito) (LEE, 2000). Assim, tratando-se de uma reação reversível, a inibição ou inativação enzimática pode ser realizada através de agentes redutores, como o sulfito que libera SO_2 (CUNHA et al., 2005) (Figura 1).

Na pesquisa do escurecimento enzimático deve-se considerar a fisiologia vegetal como um todo, já que outras enzimas que alteram a permeabilidade da membrana celular ao oxigênio, por exemplo, podem aumentar o potencial de escurecimento enzimático (SILVA et al., 2009).

Figura 1 - Reação de oxidação do fenol a catecol e à *orto*-quinona pela ação da enzima polifenoloxidase (*PPO*).



Fonte: Araújo (2008).

Os compostos fenólicos são considerados como metabólitos secundários nas frutas e hortaliças, e variam de acordo com a espécie, cultivo, grau de amadurecimento e condições ambientais de desenvolvimento e de armazenamento (MARSHALL; KIM; WEI, 2000). O tipo e a concentração do substrato fenólico afetam diretamente o escurecimento enzimático pela *PPO* (MARTÍN-BELLOSO; SOLIVA-FORTUNY, 2006). Muitos vegetais, como a maçã, têm altos níveis de compostos fenólicos pré-formados e após o corte da superfície, o escurecimento rapidamente ocorre (ARTÉS et al., 2007).

A maior ou menor sensibilidade dos vegetais ao escurecimento enzimático é o resultado da ação de diversos fatores implicados em sua intensidade. Entre os mais importantes, citar-se a espécie e a variedade (LUO; BARBOSA-CANOVAS, 1997), como ocorre com a incidência do escurecimento em maçãs minimamente processada dependendo da variedade, sendo acentuada quando ocorre aumento da temperatura (SAPERS et al., 1993; LUO; BARBOSA-CANOVAS, 1997) que segundo Sataque e Wosiacki (1987), a temperatura ótima para a atividade da *PPO* é de 30 a 40 °C. Além disso, a idade dos frutos (especialmente frutos jovens), a natureza e a quantidade dos substratos fenólicos, a atividade das enzimas oxidativas (EISSA et al., 2006), a ligação de enzimas e substratos (LÓPEZ-NICOLÁS et al., 2007), a concentração de *PPO* ativa, o pH, a temperatura e o oxigênio disponível no tecido (PINELI et al., 2005) promovem a formação das *orto*-quinonas (SOARES et al., 2009).

Assim, os estudos devem destacar o controle dos processos enzimáticos, a otimização dos tratamentos químicos e físicos que se aplicam atualmente, a busca de novas substâncias inibidoras e as combinações das diversas técnicas físicas e químicas que sejam capazes de controlar o processo sem custos econômicos elevados (ARTÉS et al., 1998).

3.2.2 Alterações microbiológicas

Os *VMP* são elaborados usando vários processos básicos, incluindo lavagem, classificação, corte e descascamento (KARAGOZLU et al., 2011). Os danos físicos ocasionados pelo processamento ou por injúrias causam a liberação de nutrientes e enzimas intracelulares que favorecem a proliferação microbiana, acelerando a deterioração (FANTUZZI et al., 2004). Como consequência, a contaminação microbiológica pode alterar a qualidade de produtos frescos e causar importante doenças veiculadas, já que naturalmente a microbiota desses produtos inclui bactérias, mofo e leveduras (NGUYEN; CARLIN, 1994; RICO et al., 2007).

A qualidade microbiológica dos *VMP* também está relacionada à presença de micro-organismos deteriorantes que poderão influenciar nas alterações sensoriais (RICO et al., 2007). Contudo, a maior preocupação ainda está relacionada com sua segurança alimentar, já que os vegetais frescos podem ser veículos de transmissão de doenças através da contaminação por agentes biológicos (VANETTI, 2004).

O tipo e espécie de micro-organismos nos produtos varia com o vegetal, com as práticas de cultivo e com as condições higiênicas durante o manuseio e processamento (ARTÉS et al., 2007). Bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* e *Escherichia coli*, são de grande importância e estão relacionados com surtos de infecção alimentar (ABADIAS, 2008).

3.2.3 Parâmetros higiênico-sanitários de controle para *VMP*

A Resolução Brasileira - RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001, para frutas frescas, "in natura", preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas para consumo direto, determina que os valores de coliformes termotolerantes não devam ultrapassar 5×10^2 UFC/g, bem como deve ocorrer ausência de salmonela em 25 g de amostra (BRASIL, 2001). Assim, quando se trata de *VMP* é importante a realização de análises microbiológicas para detectar o crescimento de micro-organismos, e garantir a qualidade higiênico-sanitária destes produtos (FAGUNDES, 2009).

A diversidade de micro-organismos presentes nos *VMP* é, no entanto, muito mais vasta do que os critérios identificados, tendo sido apontados como perigos microbiológicos para este tipo de

produtos: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Campilobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (VANETTI, 2004). Para a contagem total de bactérias, a legislação não estabelece limites, dentre as quais se destacam os psicrotóxicos, os quais crescem melhor entre 15 e 25 °C, mas podem multiplicar-se também em temperaturas inferiores a 5 °C, sendo predominantes e os principais causadores de alterações nos alimentos refrigerados (ORDÓÑEZ, 2005), participando ativamente da deterioração das frutas e hortaliças, sendo que os VMP são, em geral, mais perecíveis do que as matérias primas, devido aos tecidos danificados e a permeabilidade ao vapor d'água (SANTOS et al., 2010).

Frente às consequências do crescimento dos micro-organismos, seja decorrente de sua ação deteriorante ou de sua ação como causadores de doenças, torna-se essencial a aplicação de processos que conduzam a uma redução do número de micro-organismos e/ou da velocidade de seu crescimento em alimentos (NGUYEN; CARLIN, 1994; SOUZA, 2006).

Nos últimos anos tem havido um crescente desenvolvimento de aditivos para uso em material de embalagens para prevenir o crescimento microbiano durante o armazenamento, por meio de uma liberação do aditivo da embalagem para a superfície do alimento (DAINELLI et al., 2008; SUPPAKUL et al., 2011).

Neste sentido, alguns aditivos podem ser aplicados diretamente sobre os alimentos ou no material da embalagem reduzindo a contaminação microbiológica (HAN, 2003). Estes incluem entre outros: bacteriocinas, enzimas, fungicidas, ácidos orgânicos e seus sais, íons metálicos e extratos vegetais (SUPPAKUL et al., 2003b). Os filmes ativos podem controlar esta contaminação, reduzindo a taxa de crescimento microbiano, prorrogando o período de latência do micro-organismo alvo, contribuindo para o aumento da vida útil do produto e mantendo sua segurança alimentar (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

3.3 SISTEMAS DE ACONDICIONAMENTO PARA A CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL

Para conservar os alimentos, os sistemas de acondicionamento devem considerar diversos aspectos inerentes as características do produto, fundamentais para retardar suas alterações (SOARES et al., 2009b), bem como, o conhecimento do comportamento de enzimas e dos micro-organismos, causadores de contaminação (CAHAN et al., 2002).

Assim, existem diversas exigências ao desenvolvimento de embalagens apropriadas para atingir as condições ideais de armazenamento e conservação. A embalagem tradicional protege o alimento contra fontes de contaminação externa e do contato com substâncias como: oxigênio, gás, vapor de água, luz, entre outros agentes (FABECH et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007). Além disso, são produzidas com o objetivo de fornecer informações, conveniência e minimizar a interação entre a embalagem e o seu conteúdo (WENG; HOTCHKISS, 1993), tratando-se em termos de sua função protetora como um meio de conseguir a entrega segura e em condições sadias do produto ao usuário com um custo mínimo ou como uma tecnologia que otimize os custos de entrega de bens aumentando o lucro (BRODY, 2001).

Nos últimos anos, a incorporação de propriedades especiais aos materiais poliméricos por meio de aditivos vem permitindo a aplicação destes materiais nos mais diversos segmentos. Tais propriedades podem permitir o desenvolvimento de materiais que satisfaçam necessidades específicas de diversos setores. Assim, várias tecnologias estão sendo aplicadas para os sistemas de acondicionamento, permitindo uma maior interação entre a embalagem e o produto para preservar a qualidade e a segurança dos alimentos por mais tempo (OLIVEIRA et al., 2004b; GALIC, SCETAR, KUREK, 2011).

Além de proteção mecânica, o desenvolvimento de embalagem para vegetais deve permitir uma redução na taxa de respiração para aumentar a vida útil do produto (SARANTÓPOULOS; FERNANDES, 2001; YAMASHITA et al., 2006b). Neste contexto, a especificação de sistemas de embalagens para produtos que respiram é muito complexa (SARANTÓPOULOS, 1997), sendo necessário que estas permitam a entrada de oxigênio e saída de gás carbônico de forma adequada, para prevenir ou eliminar condições indesejáveis (FERNANDES, 2001). Assim, uma embalagem adequada para produtos de origem vegetal, visa retardar a respiração, o amadurecimento, a

senescência, a perda de cor, a perda de umidade, evitar o escurecimento enzimático, a contaminação microbiana e, conseqüentemente todas as alterações de qualidade advindas destes processos (SARANTOPOULOS, 1997).

Dentre os tipos de filmes utilizados com o objetivo de manter o frescor de frutas e hortaliças, para controlar o teor de gases e a umidade no interior da embalagem, é possível citar como exemplo: filmes com permeabilidade seletiva compatível com a taxa de respiração de cada vegetal, e filmes com a incorporação de aditivos, ou adsorvedores de etileno. Embalagens com substâncias dessecantes, desoxidantes e o revestimento de frutos têm sido usado para o mesmo objetivo (TUKADA, 2002).

A especificação da embalagem para vegetais requer a otimização de parâmetros físicos, químicos e ambientais. Dentre os quais devem ser considerados: a área superficial da embalagem em relação à massa do produto, o volume de espaço livre e suas características de permeabilidade a gases e ao vapor de água, a espécie do vegetal, qualidade inicial, estágio de desenvolvimento e sensibilidade ao etileno (ROONEY, 1995; TUKADA, 2002).

Deve-se considerar que a legislação de alimentos tem progressivamente restringido o uso de conservantes químicos nos mais diversos produtos (SOUZA, 2006). Assim, para melhorar os sistemas de acondicionamento dos alimentos fabricados e atender a demanda dos consumidores para as adições mínimas de conservantes, surge uma nova discussão sobre as opções inovadoras e emergentes para o alcance da segurança dos alimentos a citar, o desenvolvimento de embalagens com novas aplicações: as embalagens ativas (CAHAN et al., 2002) que visam o planejamento de interações desejáveis com o produto, aumentando ou monitorando sua vida de prateleira perdendo a função inerte e/ou passiva sobre o alimento (FABECH et al., 2005). Porém, o tipo de material polimérico utilizado na composição da embalagem é importante para o sucesso desta aplicação.

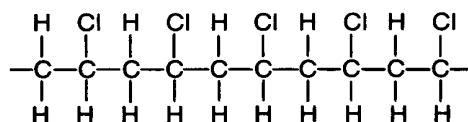
Os polímeros são os principais materiais usados na produção de embalagens de produtos alimentícios (DE BONA et al., 2007). Dependendo das características do alimento, vários materiais poliméricos podem ser aplicados. As principais resinas utilizadas para produzir filmes são: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PE), Poli (cloreto de vinila) (PVC) e politereftalato de etileno (PET) (VIANNA et al., 2006).

3.3.1 O Poli (cloreto de vinila) (PVC) como material de embalagem

Os filmes de PVC são largamente empregados no acondicionamento de frutas e hortaliças *in natura* e minimamente processadas, pois permitem uma avaliação visual do alimento, impedem a desidratação do produto, são de fácil manipulação e baixo custo (BELTRAME et al., 1999; YAMASHITA, et al., 2006). Uma série de filmes com barreiras diferentes são necessárias para preservar o frescor de frutas e hortaliças minimamente processados, com diferentes taxas de respiração e um dos mais indicados é o filme de PVC (SARANTÓPOULOS, 1997).

O PVC é um termoplástico vinílico, obtido a partir da polimerização do monômero cloreto de vinila (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Sintetizado a partir do dicloroetileno, que por sua vez é obtido a partir da reação entre o cloro e monômero de etileno (POUZADA; CASTRO, 2003). A estrutura molecular do PVC é uma cadeia polihalogenada com átomos de cloro ligados covalentemente a átomos de carbono. O átomo de cloro se distribui na molécula de forma linear (Figura 2) (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Figura 2 - Estrutura química do Poli (cloreto de vinila) (PVC).



Fonte: Sarantopoulos et al. (2002).

A alta polaridade da molécula faz do PVC um polímero rígido à temperatura ambiente. Para torná-lo mais aplicável no segmento de embalagens, geralmente é plastificado para a produção de filmes flexíveis. Dependendo das propriedades a serem obtidas, outros aditivos como estabilizantes, lubrificantes, pigmentos, são incorporados à resina, originando as diferentes formulações também conhecidas como compostos de PVC (BRASKEM, 2002). Para a sua produção com grau alimentar ou atóxico, os aditivos precisam ser aprovados pela legislação. Geralmente, o alto grau de aditivação do PVC pode chegar a 15% para os rígidos e até 40% para os flexíveis (MARILYN, 1986).

A grande versatilidade do PVC deve-se, em parte, também à sua adequação aos mais variados processos de moldagem, bem como a diversidade de propriedades apresentadas, tais como as propriedades mecânicas, físicas, resistência à abrasão, alta compatibilidade com aditivos e baixo custo (SOUZA et al, 2006b). Dentre as principais características estão: as propriedades físicas e mecânicas que dependem da formulação; o uso de plastificantes para não se tornar quebradiços; plastificantes são importantes por diminuírem a barreira do PVC; os filmes são transparentes e brilhantes; apresentam boa resistência aos óleos e gorduras; apresentam boa resistência aos hidrocarbonetos não polares; quando decompostos pelo calor, liberam ácido clorídrico na forma de cloreto de hidrogênio, gás tóxico e corrosivo (POUZADA; CASTRO, 2003).

O PVC é o termoplástico mais utilizado mundialmente (NUNES et al., 2006). Sua aplicação é tão ampla, como a sua versatilidade em propriedades, sendo utilizado como filmes plastificados esticáveis (*stretch*), como envoltório em produtos *in natura*, para venda em supermercado e para uso doméstico (ALVES, 1998). Dentre as vantagens mais significativas dos filmes de PVC estão: a elevada transparência, a permeabilidade a gases, superior às poliolefinas, e a versatilidade em design (ALVES et al., 1998; BRASKEM, 2002. SARANTÓPOULOS, et al., 2002). Os principais exemplos de aplicações são: filmes plastificados e esticáveis; filmes termoencolhíveis; filmes para uso como envoltório de bandejas, garrafas e frascos diversos (WENG, 2006).

3.4 EMBALAGENS ATIVAS APLICADAS EM ALIMENTOS

Sistemas de embalagens ativas e inteligentes representam tecnologias emergentes que podem ter implicações profundas sobre a qualidade, segurança e integridade dos alimentos embalados (BODAGHI et al., 2012).

São embalagens com inovadores conceitos que têm sido apresentadas como uma resposta às exigências dos consumidores (RESTUCCIA, 2010) pela alta qualidade, segurança e prolongada vida de prateleira de produtos alimentícios (MAURIELLO, et al., 2005; ALMENAR et al., 2007). Também, atendem às mudanças no varejo e práticas de distribuição, às novas tendências e ampliações dos mercados, resultando no aumento da distância da distribuição e no maior período de armazenamento (VERMEIREN et al., 1999; QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

Esta tecnologia consiste de interações entre o alimento, *headspace* e a embalagem para alcançar os resultados desejados (LABUZA, 1996; ROONEY, 1995), modificando alguma propriedade desejável: nutricional, microbiológica e/ou físico-química (ROONEY, 1995). Segundo Appendini e Hotchkiss (2002) e Soares et al., (2009b), as embalagens ativas vêm sendo utilizadas para aumentar a vida útil, melhorar as características sensoriais, evitar as deteriorações química e microbiológica, inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, proporcionando uma interação que objetiva preservar a qualidade e a segurança do alimento (SOARES et al., 2010).

De acordo com Scannel et al. (2000), trata-se de um conceito que combina avanços em tecnologia de alimentos, segurança dos alimentos, embalagens e materiais em um esforço para melhor atender às demandas de consumidores por alimentos mais frescos e seguros. Outra definição pode ser dada como: um sistema desenvolvido para interagir de forma desejável com o produto, modificando alguma propriedade, condições de armazenamento para aumentar a vida de prateleira, ou suas propriedades sensoriais (BRODY, 2001; YAM et al., 2005).

Os sistemas de embalagens ativas devem acumular funções adicionais, entre as quais podem ser destacadas: (a) absorção de compostos que favorecem a deterioração, (b) liberação de compostos que aumentam a vida de prateleira, e (c) monitoramento da vida de prateleira. Estes sistemas recebem aditivos e estão em contato com a superfície do produto, onde a maioria das reações químicas e microbiológicas ocorre (SOARES et al., 2009), liberando de forma controlada, o composto para o alimento, aumentando a eficiência de sua ação reduzindo o impacto causado pelo uso abusivo de conservantes adicionados diretamente aos alimentos (QUINTAVALLA; VICINI, 2002) atendendo uma tendência atual do consumidor por alimentos com teores reduzidos de aditivos (OLIVEIRA, 2004).

Para Fabech et al. (2005), além de fornecer uma barreira protetora, podem controlar e até reagir com os fenômenos dentro do sistema, não sendo uma barreira inerte às influências externas. Já para Ahvenainen (2003), os sistemas ativos procuram corrigir deficiências presentes na embalagem convencional.

Yam et al. (2005) citam que uma embalagem ativa deve ter um ponto específico para interação. O ponto de interação é definido como o ponto crítico de controle de conservação da

reação indesejável que ocorre levando o produto ao estado impróprio para consumo. Portanto, a técnica de acondicionamento deve ativar mudanças ou propriedades de permeação, concentração de gases, acrescentar agentes de qualidade microbiológica, antioxidantes ou, por exemplo, substâncias para realçar sabor, alterar o estado dos alimentos embalados por prolongar a durabilidade, melhorar a segurança ou suas propriedades sensoriais (FABECH et al., 2005).

Esse conceito amplo permite distintas possibilidades incluindo dois objetivos: aumentar a vida útil e facilitar o processamento e o consumo. O primeiro objetivo pode ser alcançado pelo uso de absorvedores de umidade, controle de gases, agentes antimicrobianos e antiescurecimento. O segundo objetivo oferece o desenvolvimento de embalagens de acordo com as características do produto, com novas formas de apresentação no mercado, reduzindo custos e incluindo operações de processamento ou o controle do processo de embalagem, bem como a redução do uso de aditivos em alimentos (ALVAREZ, 2006).

De acordo com Appendini e Hotchkiss (2002), uma das melhores formas de reduzir, inibir ou retardar o crescimento superficial de micro-organismos em alimentos envasados é a aplicação de agentes antimicrobianos nos sistemas de embalagens, podendo prolongar a vida útil dos alimentos. A inibição do crescimento microbiano em alimentos é uma das maneiras mais importantes para prolongar a vida de prateleira de produtos embalados (BODAGHI et al, 2012).

3.4.1 Aspectos a considerar no desenvolvimento de filmes ativos

Alguns aspectos estão relacionados à efetividade da embalagem ativa, como as características do agente ativo (solubilidade e tamanho da molécula) e do alimento, condições de estocagem e distribuição (tempo e temperatura), método de preparo do filme e interação entre o aditivo e polímero (SOARES et al., 2009). Para a transformação dos materiais termoplásticos em filmes ativos são utilizados processos de extrusão industrial e *casting*. No processo *casting*, o polímero é solubilizado e depois espalhado em superfície plana e o solvente evaporado, utilizando temperaturas baixas, de até 80 °C. A baixa temperatura evita a degradação por calor de diversos aditivos, mantendo a ação antimicrobiana. O processo de produção de filmes por extrusão utiliza temperatura maior do que o ponto de amolecimento do polímero, podendo variar de 150 a 450 °C (WURLITZER, 2007).

O processo de extrusão é o maior fator de perda de atividade do composto. Geralmente, quando compostos químicos são misturados a materiais de embalagem, as propriedades mecânicas não são alteradas significativamente, sendo as propriedades óticas (cor, transparência e brilho) as mais afetadas. Para a transformação dos materiais termoplásticos em filmes pelo processo de extrusão, caso venha a ser adicionada substância ativa, esta não pode sofrer degradação na temperatura utilizada (WURLITZER, 2007).

Além disso, os agentes ativos adicionados devem ser quimicamente compatíveis, e ainda deve-se considerar a possibilidade de migração de resíduos para o alimento. No caso de agentes antimicrobianos, a seleção depende essencialmente de sua atividade contra os micro-organismos alvo (AHVENAINEN, 2003).

O material usado na obtenção da embalagem ativa também deve manter inalteradas ou pouco alteradas as propriedades físicas, mecânicas e óticas como resistência à tração, alongamento e selagem a quente. Outros fatores como o método de incorporação na embalagem, permeação, evaporação e liberação controlada, devem ser considerados (YAMADA, 2004).

De acordo com Rooney (1995), outros aspectos devem ser considerados no desenvolvimento dos referidos filmes sendo: o espectro de micro-organismos contra os quais o filme é efetivo (podem inibir a deterioração sem afetar o crescimento de patógenos); o efeito da atividade antimicrobiana (redução da taxa de crescimento ou promoção da morte celular); a extensão com que o agente migra para o alimento; a toxicidade, a regulamentação e o efeito na composição do produto (alguns antimicrobianos são efetivos somente em determinado pH).

Com a vantagem da difusão controlada, esses compostos da embalagem para a superfície do alimento, atendem a demanda atual do consumidor, que é a busca por alimentos livres de conservantes ou com teores mínimos de aditivos. Assim, fica disponível especialmente na superfície do produto, onde a maior parte das deteriorações ocorre (OLIVEIRA, 2004).

A concepção de um sistema de acondicionamento ativo requer o conhecimento da tecnologia de liberação controlada e da cinética de crescimento microbiano (LACOSTE et al., 2005). Quando a taxa de migração de um aditivo é mais rápida do que a taxa de crescimento do micro-organismo, o aditivo estará esgotado antes do período de armazenamento esperado e o sistema de embalagem vai perder a sua atividade, resultando no crescimento de micro-organismos

após o esgotamento do agente ativo. Por outro lado, quando a taxa de liberação é muito lenta, os micro-organismos podem crescer antes de o agente ser liberado. Portanto, a liberação para os alimentos deve ser controlada de acordo com a taxa de crescimento dos micro-organismos alvo (HAN, 2000; MISTRY, 2006). Neste contexto, o uso de aditivos encapsulados, poderia auxiliar no alinhamento entre a cinética de crescimento microbiano *versus* liberação do inibidor.

3.5 ADITIVOS APLICADOS EM POLÍMEROS DESTINADOS AO ACONDICIONAMENTO DE ALIMENTOS

A utilização de aditivos químicos pelas indústrias de alimentos tem possibilitado o acesso a uma diversidade cada vez maior de alimentos pela população mundial (POPOLIM, 2009). Vários aditivos químicos podem ser liberados a partir de uma embalagem, a fim de aumentar a vida-de-prateleira do produto. A maior parte são os conservantes, que podem ser liberados controladamente sobre a superfície de um alimento, através de difusão e evaporação a partir do filme ou por meio de reação química ou enzimática. A importância deste processo pode ser maior para o caso dos vegetais, já que tratamentos térmicos são contraindicados na manutenção do frescor desejável (LABUZA, 1996).

Estes compostos podem ser aplicados para uso em embalagens. A escolha do agente ideal deve considerar: tipo de alimento, método de processamento, armazenamento, micro-organismo envolvido, níveis tóxicos (JAY, 1992) e a legislação sobre a lista positiva de aditivos para materiais poliméricos em contato com alimento (BRASIL, 2008).

Para produtos de origem vegetal, há poucos compostos disponíveis eficazes (SANTOS et al., 2009) que podem ser aplicados para o controle do escurecimento enzimático e segurança microbiológica (FAN et al., 2009). Segundo Silva et al. (2009); Fernandes et al. (2010) e Santos et al. (2010), no caso de *VMP*, ainda não há legislação específica no Brasil, estabelecendo os tipos de inibidores de escurecimento permitidos e os limites de aplicação.

3.5.1 Agentes sulfitantes

Os sulfitos são aditivos alimentares multifuncionais que previnem reações indesejáveis (JUNQUEIRA et al., 2009), pois são utilizados para a conservação dos alimentos com eficiência para prevenir diversas reações, como o crescimento bacteriano, reações enzimáticas e não enzimáticas, controlando alterações indesejáveis nos alimentos e mantendo sua qualidade (LI; ZHAO, 2006). Esses aditivos liberam o gás dióxido de enxofre (SO_2) ao entrar em contato com a umidade do próprio alimento (SARANTOPOULOS; MORAES, 2009).

Apresentam aplicações importantes, como agentes antimicrobianos, atuando como inibidores das enzimas desidrogenases bacterianas e fungistáticas; branqueadores e antioxidantes, para prevenir a oxidação (sequestradores de oxigênio e agentes redutores), inibindo várias enzimas, incluindo as proteases, oxidases e peroxidases (OUGH, 1986; WEDZICHA, 1992; BILLAUD et al., 2003). Assim, são compostos com propriedades antiescurecimento e antimicrobiana (EISSA et al., 2006; LU et al., 2007).

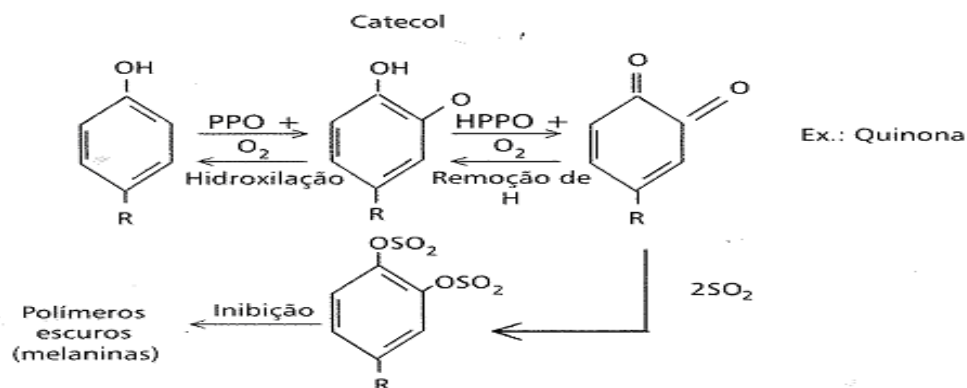
O SO_2 preserva a textura, o odor, o conteúdo de vitaminas e a cor dos alimentos, tornando-os atrativos ao consumidor. Devido a estas múltiplas funções, o tratamento com este aditivo é amplamente utilizado na indústria de alimentos (IYENGAR; MCEVILY, 1992). Os sulfitos são usados em vários produtos: como conservantes em frutas secas, frutas e legumes frescos, sucos, bebidas fermentadas, licores, bebidas carbonatadas, em produtos cárneos como salsichas, peixes, linguiças, dentre vários alimentos (WEDZICHA, 1992; POPOLIM, 2009).

Os sulfitos são utilizados como inibidores de inúmeras enzimas (ARTÉS et al., 2007), incluindo a *PPO*. A atividade enzimática é alta em alimentos que são particularmente sensíveis ao escurecimento oxidativo, como batatas, maçãs, cogumelos, bananas, pêssegos, sucos de frutas e vinhos. Sulfitos podem inibir diretamente a enzima ou também interagir com os intermediários da reação de escurecimento, impedindo sua participação nas reações que levam à formação de pigmentos escuros (TAYLOR, 1993; WARNER et al., 2000; BILLAUD et al., 2003).

De acordo com Oetterer (2006), o sulfito é um inibidor por excelência da atividade da *PPO* de forma direta e irreversível, onde a inativação enzimática ocorre por meio da reação do sulfito com o grupo Cu^{+2} da enzima, cujo mecanismo é desconhecido, e pela reação irreversível com o

substrato, por meio da complexação com a quinona, bloqueando subsequentemente a reação de polimerização, evitando a formação de pigmentos escuros (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação do sulfito, bloqueando a reação de polimerização através da formação das sulfoquininas.



Fonte: Oetterer (2006).

Diversos trabalhos de utilização de SO_2 foram realizados desde 1954, quando Joslyn e Braverman aplicaram SO_2 em produtos como maçã e batatas, palmito, abacate e manga como um bom meio para o controle do escurecimento enzimático. A comparação do efeito do calor, do SO_2 e do ácido ascórbico, para controlar o escurecimento enzimático de frutas e hortaliças também foram estudadas e os resultados mostraram que o SO_2 foi o mais eficiente para a pêra (NOGUEIRA, 1989). São utilizados também nos sistemas absorvedores de oxigênio, a base de antioxidantes, sendo prontamente ativados pela alta umidade e temperatura (NOGUEIRA, 2005).

Sarantópoulos e Moraes (2009) citaram *saches* de metabissulfito de sódio que, quando em contato com a umidade do alimento, ocasionam a liberação de SO_2 , eficiente na inativação de bactérias e fungos indesejáveis em uvas, preservando-as por até 140 dias. Da mesma forma como Ahvenainen (2003), indicou a aplicação de *sache* emissor de SO_2 para controle de bolores em frutas, quando incorporado em material poroso. Yamada (2004) cita o SO_2 como um fungicida, importante agente antimicrobiano.

Autores relatam pesquisas com agentes antiescurecimento aplicados em vegetais. Em maçãs, metabissulfito de sódio, resorcinol, ácido ascórbico, cisteína foram testados (EISSA et al., 2006); bissulfito de sódio e L-cisteína em maçãs (OLIVEIRA et al., 2008); ácido ascórbico/cítrico

e metabissulfito de sódio, aplicados em batatas (JUNQUEIRA et al., 2009). Carneiro et al. (2003) estudaram diferentes inibidores de enzimas oxidativas em fatias de guariroba imersas em soluções de ácidos e bissulfito de sódio nas concentrações de 0,5, 0,8 e 1,0% (p/v), por intervalos de 10, 15 e 20 minutos. Rosa e Abreu (2002) citaram a aplicação de metabissulfito de sódio para evitar o escurecimento de água de coco.

Os sulfitos demonstram eficácia no controle do escurecimento resultante de reações enzimáticas, e também para o escurecimento de origem não enzimática, como foi verificado em batatas e frutas desidratadas (ENDO et al., 2006).

Em princípio, se pode pensar em sua incorporação ao sistema de envase para conservar melhor as propriedades sensoriais dos produtos (ÁLVAREZ, 2006). A Tabela 1 ilustra os sulfitos utilizados como aditivos alimentares permitidos pela legislação brasileira.

Tabela 1 - Fórmulas químicas, rendimento teórico de SO₂ e respectivos números de identificação internacional dos agentes sulfitantes.

Substância	Fórmula Química	Rendimento teórico (SO ₂ - %)	INS – Sistema Internacional de Numeração
Dióxido de enxofre	SO ₂	100	220
Metabissulfito de sódio	Na ₂ S ₂ O ₅	67,4	223
Metabissulfito de potássio	K ₂ S ₂ O ₅	57,6	224
Sulfito de cálcio	CaSO ₃ .2H ₂ O	64,0	226
Bissulfito de potássio	KHSO ₃	53,3	228
Bissulfito de sódio	NaHSO ₃	62,6	222

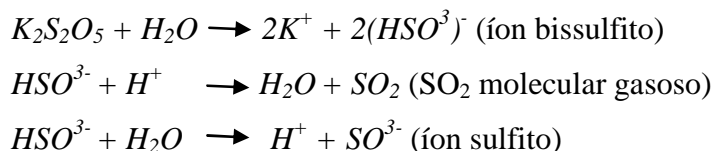
Fonte: Wedzicha (1992); Luck e Jager (1997); Abia (2001); Brasil (2005); Eissa et al. (2006); Machado et al. (2006); Lu et al. (2007);

Os agentes sulfitantes são quimicamente equivalentes após a incorporação no alimento, uma vez que são convertidos às mesmas espécies iônicas ou não-iônicas em um determinado pH, força iônica, concentração não-eletrolítica e temperatura, conforme a dissociação do *MBSK* em meio aquoso (WEDZICHA, 1992; LECLERCQ et al., 2000) (Figura 4).

As reações químicas originárias quando o sulfito é adicionado às frutas e outros alimentos são complexas, sendo convertido principalmente em íon bissulfito (TAYLOR, 1993). O íon

bissulfito é a espécie predominante em alimentos que apresentam pH entre 3 e 7, enquanto que em valores de pH menores do que 3 e maiores do que 7, o desvio do equilíbrio é direcionado para a formação de SO₂ molecular e íon sulfito, respectivamente (WARNER et al., 2000).

Figura 4 - Esquema da dissociação do MBSK em meio aquoso



Fonte: Simon (1996).

A reatividade dos sulfitos em alimentos deve-se ao elevado potencial nucleofílico do íon bissulfito (WEDZICHA, 1992). O SO₂ molecular como um gás ou molécula simples, é a única forma que pode atravessar as paredes celulares de leveduras e bactérias. Quando comparado ao íon bissulfito, possui ação antimicrobiana 500 vezes mais ativa contra leveduras e 1000 vezes contra bactérias (USSEGLIO-TOMASSET, 1992).

Com relação a inibição enzimática, a forma de ação do SO₂ ainda não é completamente elucidada. Alguns autores sugerem que ocorre uma inibição competitiva do sulfito sobre a enzima, por se ligar a um grupo sulfidril em um sítio ativo da enzima (BILLAUD et al., 2003), sendo mais provável que mecanismos múltiplos atuem em conjunto, o que poderia explicar as diferenças observadas entre os vários casos registrados de sensibilidade a esses compostos, o que inibe irreversivelmente a *PPO* (TAYLOR, 1993).

Outro potencial de aplicação do SO₂ está associado à segurança alimentar em produtos de maçã devido à necessidade de reduzir os níveis de patulina, uma micotoxina produzida pelos gêneros *Penicillium*, *Byssochlamys*, *Paelomyces* e *Aspergillus* que causa danos à saúde humana (PADUA et al., 2005). Dentre os métodos para redução dos fungos causadores desta toxina, destaca-se este aditivo (BISSESSUR; PERMAUL; ODHAV, 2001). Podgorska (1992) avaliou o efeito de vários conservantes utilizados industrialmente em produtos derivados de frutas, adicionando os mesmos em meios de cultura onde cultivou *P. expansum*. Observou-se que o SO₂ teve o maior efeito inibitório no crescimento do fungo e na produção de patulina. Semelhante resultado já havia sido observado por Harrison (1989).

Os sulfitos são citados como absorvedores de oxigênio, que pode ser prontamente ativado em sistemas com altas taxas de umidade e de temperatura, após o preenchimento e selagem da embalagem, tendo também estabilidade térmica suficiente para passar, sem modificações, através dos processamentos de termoplásticos (NOGUEIRA, 2005).

Os sulfitos, provavelmente, considerados os mais efetivos e os mais econômicos agentes antiescurecimento, estão sujeitos a restrições devido aos efeitos adversos que podem causar à saúde, como alergias (SIMON, 1996; WARNER et al., 2000; SON; MOON; LEE, 2001) e ao produto, como perda de textura, desenvolvimento de sabor desagradável e perda de vitamina B1 (Tiamina) (SIMON, 1996; ROUX et al., 2003; JUNQUEIRA et al., 2009), sendo restrito seu uso pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (AHVENAINEN, 1996; EISSA et al., 2006). Os sulfitos também provocam a corrosão de equipamentos (PINELI et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2009). O Brasil, como outros países segue as recomendações internacionais na utilização segura de aditivos. Segundo *The Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e *Food and Agriculture Organization* (FAO), a ingestão diária máxima recomendada é de 0,7 mg de $\text{SO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ de peso corpóreo (MARSHALL; KIM; WEI, 2000).

Em relação à sensibilidade aos sulfitos, diversos estudos apontam seu efeito sobre indivíduos alérgicos e muitos países estabelecem limites rigorosos sobre a quantidade residual de sulfitos em diferentes tipos de alimentos (LI; ZHAO, 2006). É importante considerar os seguintes aspectos (POPOLIM, 2004): a) as reações dependem do nível de sulfitos residuais no alimento, da sensibilidade do indivíduo e do tipo de alimento; b) não há evidências de que evitar o consumo de todas as fontes de sulfitos melhora os sintomas da asma; c) a exposição de indivíduos que não são sensíveis aos sulfitos representa um risco muito pequeno a essas pessoas; d) os sulfitos não são desnaturados pela cocção; e) os sulfitos são altamente reativos na presença de proteínas, amido e açúcares. Os sulfitos não são eliminados pelo processo de lavagem dos alimentos.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2005), o SO_2 e seus sais são empregados a alguns alimentos com limites residuais, conforme ilustrado na Tabela 2. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2008b), o *Codex Alimentarius* em 2006, através do documento CAC/STAN 192-1995, Revisão 7, aprovou o uso de metabissulfito para a categoria de alimento 04.1.1.2: tratamento de superfície de frutas frescas, com limite máximo de $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (como SO_2 residual). No caso de sua aplicação em embalagens ativas, de acordo com a lista positiva de aditivos para

matérias poliméricas (BRASIL, 2008), o limite máximo de migração do sulfito em SO₂ para o alimentos é de 10 mg.kg⁻¹.

Tabela 2 - Alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados com a função de conservadores e seus respectivos limites máximos.

Alimentos	Limite máximo (% SO ₂ residual)
Batata descascada cozida	0,01
Frutas desidratadas	0,01
Legumes e verduras desidratadas	0,02
Polpas de vegetais	0,03
Purê de vegetais	0,06

Fonte: Abia (2001); Brasil (2005).

3.5.2 Migração do agente da embalagem para o alimento

A migração dos agentes para o alimento é um elemento essencial para a efetiva inibição do crescimento de micro-organismos na superfície dos produtos alimentares. Enquanto a concentração do agente é mantida na concentração mínima inibitória (CMI) sobre a superfície do alimento, o sistema ativo deve apresentar atividade efetiva (SUPPAKUL, 2003).

O sistema de liberação permite a migração do agente (soluto ou gás) para o alimento ou do *headspace* da embalagem, sendo, portanto, a transferência do material da embalagem para o alimento. Considerando que um agente gasoso pode penetrar em qualquer espaço, um agente do soluto não pode migrar entre os alimentos e o material de embalagem (MISTRY, 2006).

Além disso, a cinética de liberação deve ser projetada para controlar a atividade enzimática ou microbiana e manter a concentração do agente acima da concentração crítica inibitória (HAN, 2000). Um agente incorporado ao material de embalagem pode migrar para os alimentos através da difusão e particionamento (MISTRY, 2006).

A distribuição equilibrada de uma substância entre o espaço livre, materiais de embalagem e os alimentos devem ser considerados como parte principal do mecanismo de migração para

estimar a distribuição da substância (HAN, 2003). Em comparação com uma substância não-volátil, que só pode migrar através da área de contato entre a embalagem e o alimento, uma substância volátil pode migrar através do espaço livre entre a embalagem e os alimentos (MISTRY, 2006). O controle das taxas de liberação e a migração do agente das embalagens para o produto são muito importantes para avaliar a eficiência do processo (LACOSTE et al., 2005).

3.6 PROCESSOS DE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS

Entre as novas tecnologias de interesse para serem utilizadas na produção industrial, o encapsulamento encontra-se em rápida expansão, com grandes potenciais de aplicações em áreas como a farmacêutica (JAFARI et al., 2008; EZHILARASI et al., 2012), de aromas e sabores, química, agrícola, dentre outras, onde houve na última década um grande progresso no desenvolvimento de encapsulados (OZÓRIO, 2007). A microencapsulação é amplamente utilizada para liberação controlada de medicamentos, vacinas e compostos bioativos (FELT; BURI; GURNY, 1998). Destaca-se por permitir um controle sofisticado de certas propriedades, especificamente nas superfícies e interfaces de materiais (HENCH; WEST, 1990).

O encapsulamento é um processo de empacotamento pelo qual partículas pequenas de materiais de núcleo são embaladas dentro de um material de parede dessas partículas com propriedades específicas (compostos de sabor, pigmentos, acidulantes, nutrientes, enzimas, conservantes). O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (GIBBS et al., 1999). Pode ser definida como um procedimento no qual se recobre uma substância de interesse por um material que a isole total ou parcialmente do ambiente (RÉ, 1998).

Além da função de proteção, outras vantagens podem ser associadas à encapsulação de substâncias, como: reduzir interações do núcleo com fatores ambientais retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, sofrer alteração de cor ou perda do valor nutricional; separar componentes reativos ou incompatíveis; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, que é muito rápida no caso de compostos de sabor não encapsulados); mascarar compostos indesejáveis como sabor, odor e pH; promover melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas secos (DEPYPERE, 2003; OZORIO, 2007).

As embalagens ativas permitem desenvolver ou melhorar propriedades dos materiais, assegurando melhor proteção dos alimentos contra efeitos microbiológicos, mecânicos, térmicos ou químicos, além de aumentar a vida de prateleira. Envolve um processo complexo que permite incorporar a um material ativo, novas propriedades como a liberação ou atuação controlada em um meio específico ou, sob condições apropriadas, tornando mais eficaz o produto final do qual esse material faz parte (RÉ, 2000). Alguns dos usos potenciais incluem a modificação de características de permeabilidade em filmes, aumento das propriedades de barreira, melhoria das propriedades de resistência mecânica e térmica, ação antimicrobiana, marcadores para rastreabilidade e uso de nanocompostos para detecção de patógenos e contaminantes (EL AMIN, 2005).

Além disso, permitir que a liberação do material do núcleo ocorra lentamente com o tempo, ou a partir da ocorrência de certo evento. Esse conceito é denominado de liberação controlada, podendo, portanto, referir-se ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação, que ajuda a evitar a utilização inefetiva e a perda de compostos durante o processamento. A liberação controlada de conservantes encapsulados melhora sua eficiência, reduzindo o teor requerido desses aditivos. O material de parede é usado para cobrir, dar forma à cápsula, reter o recheio e permitir a sua liberação quando desejado (MONCADA, 2007). Materiais hidrossolúveis podem também ser encapsulados. Entretanto, ao invés da existência de um núcleo e uma cobertura claramente definidos, o produto consiste de uma matriz homogênea do polímero envolvendo partículas do núcleo (DZIEZAK, 1988).

A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de uma série de fatores, como: tamanho de partículas requerido, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (RÉ, 1998; AZEREDO, 2005). O material a ser encapsulado pode ser o alimento ou uma determinada classe de compostos (ingredientes ou aditivos), embora esta última aplicação seja mais frequente (PIRES, 2010). O encapsulamento de ácidos orgânicos utilizados como conservantes em panificação, como o ácido sórbico, evita uma queda prematura do pH, que poderia comprometer o crescimento das leveduras. A liberação desses ácidos, por outro lado, é requerida durante a estocagem, quando sua ação contra o crescimento de fungos é necessária (AZEREDO, 2005). As características funcionais das cápsulas produzidas dependem além do material de parede escolhido, das características do material de recheio, do método empregado na produção e do meio onde serão utilizadas (PIRES, 2010).

Apesar da grande variedade de estudos na área de produtos farmacêuticos e cosméticos, o encapsulamento tem encontrado, até o momento, relativamente pouco espaço na indústria de alimentos. Uma das razões é o fator custo. No entanto, deve-se considerar que muitos compostos de grande impacto/mercadológico na indústria de alimentos, são altamente degradáveis, perdendo suas propriedades de interesse e, conseqüentemente, seu valor de mercado. Com base nos resultados de inúmeros trabalhos, indicando que as técnicas de encapsulação podem proteger esses compostos, aumentando sua estabilidade, pode-se assumir o alto potencial para expandir mercados de produtos de alto valor agregado (AZEREDO, 2005).

3.6.1 Método sol-gel

Diferentes tipos de materiais podem ser usados como suportes para os processos de encapsulação (SEVERN et al., 2005). O sucesso no uso de um determinado material é dependente de um conjunto de propriedades texturais (arranjo espacial dos poros, área específica e diâmetro dos poros). Além de interação entre o suporte e o complexo imobilizado (NOVOKSHONOVA, 2005). Polímeros diversos como polissacarídeos, celulose, lipídeos, proteínas e materiais inorgânicos (silicatos, argilas etc.) apresentam as características supracitadas e são muito utilizados na encapsulação de compostos (AZEREDO, 2005; PIRES, 2010).

Dentre os materiais usados está a sílica amorfa mesoporosa que faz parte de uma classe de substâncias inorgânicas mais utilizadas como suporte de uma variedade de sistemas com aplicação em diversas áreas que além de produzir um catalisador adequado, permite um controle sobre a morfologia da partícula durante a síntese (SEVERN, 2005). A sílica é um material utilizado em diferentes aplicações por modificações de superfície. A modificação da superfície da sílica pode ser conseguida por um certo número de métodos, sendo feita a escolha do método mais adequado, dependendo da solubilidade do material do núcleo, do constituinte da casca; do tamanho de cápsula desejado; da espessura e da permeabilidade ideal da membrana, bem como da taxa e forma ideais de liberação (RÉ, 2000).

Um dos métodos mais importantes é a técnica de *sol-gel* (PODBIELSKA; ULATOWSKA-JARZA, 2005), que na última década tem sido muito usado na preparação de novos materiais híbridos (ESTEVES et al., 2004). Envolve a formação de uma rede polimérica inorgânica por

reações de geleificação (BENVENUTTI et al., 2009). Além da possibilidade de obter componentes orgânicos e inorgânicos altamente dispersos, o método apresenta grande versatilidade, condições brandas de reação, especialmente baixas temperaturas, permitindo inserir a matriz sólida biomoléculas como enzimas, proteínas e anticorpos (KICKELBICK, 2008). Além disso, os nanocompósitos obtidos são, de forma geral, muito puros e homogêneos (ESTEVEES et al., 2004). Além disso, promove maior controle do processo, e combinação de várias propriedades desejáveis (HENCH; WEST, 1990; CAPELETTI et al., 2011).

O termo sol é usado para definir qualquer dispersão de partículas de dimensões coloidais em um líquido (HARRIS, 2001). O termo gel pode ser visto como sendo um sistema formado por uma rede rígida porosa de partículas coloidais (gel particulado) ou, cadeias poliméricas, que se encontram imersas em um líquido independente (VOGEL, 2002). As reações químicas que ocorrem durante a formação do sol e do gel influenciam a composição e as propriedades do produto final (BRINKER; SCHERER, 1990; CAPELETTI, 2010).

A técnica sol-gel permite a preparação de materiais com diversos componentes e em alguns casos, de materiais impossíveis de serem preparados por processos convencionais, sem necessidade do processo de fusão (BAE; CHAN; Yi, 2000). Uma das vantagens principais de processamento *sol-gel* é a possibilidade de sintetizar materiais híbridos orgânico-inorgânicos (PODBIELSKA, ULATOWSKA-JARZA, 2005). Os híbridos que apresentam como componente inorgânico a sílica, são os mais importantes estudados e aplicados tecnologicamente, especialmente pelo maior controle durante o processo de geleificação, já que apresentam lenta cinética de reação (BENVENUTTI, 2009).

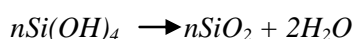
O método *sol-gel* apresenta basicamente as etapas de geleificação/polimerização, envelhecimento e secagem. O processo de síntese se baseia na hidrólise de TEOS em meio alcoólico catalisado por ácido ou base. Na etapa de geleificação, sob condições básicas, a água dissocia-se para produzir grupos hidroxilas, OH^- em uma etapa rápida, e em seguida esses ânions atacam o átomo de silício, substituindo os grupos alcóxidos (OR^-). Uma vez que um dos grupos alcóxidos é hidrolisado, os outros também são para formação do $\text{Si}(\text{OH})_4$. Após esta reação ocorre a condensação do $\text{Si}(\text{OH})_4$ resultando na formação de partículas esféricas de sílica (HENCH; WEST, 1990; BRAMBILLA et al., 2007; BENVENUTTI et al., 2009) (Figura 5).

Figura 5 - Etapas do processo de síntese de matriz encapsulada em sílica

Etapa 1:



Etapa 2:



Fonte: Benvenuti et al. (2009)

A etapa de envelhecimento do gel pode ser definida como sendo o tempo estabelecido entre o ponto de geleificação e a remoção do solvente. A etapa de secagem consiste na remoção do líquido entre o gel, através da evaporação do solvente que pode ocorrer à temperatura ambiente (xerogéis) ou em condições supercríticas de temperatura e pressão (aerogéis) (BENVENUTTI et al., 2009).

A estrutura, textura e morfologia dos xerogéis de sílica híbridos são fortemente influenciadas pelas condições de síntese, tais como pH, teor de água e as concentrações de reagente (PODBIELSKA; ULATOWSKA-JARZA, 2005). Um grande número de organoalcoxissilanos tendo diferentes grupos funcionais orgânicos foram utilizados para a síntese de híbridos de sílicas, entre eles, n-aminopropiltrióxissilano (APTES), representado quimicamente por $[Si-(CH_2)_3-NH_2]$, abreviado por (Si-NH₂), que tem sido largamente utilizado para a modificação de sílica e tem encontrado muitas aplicações na indústria (BRAMBILLA et al., 2011).

No caso da aplicação de *MBSK*, a sensibilidade ao calor e a insolubilidade em solventes apolares restringe a aplicação destas substâncias, haja vista que metodologias de processamento exigem, muitas vezes, condições não brandas de manipulação desses materiais. Assim, a encapsulação em uma matriz resistente como a sílica pode conferir estabilidade aos compostos, sem comprometer a estrutura e atividade do material. A síntese dessas sílicas híbridas permite ainda obter matrizes com superfície de polaridade controlada e de características texturais (porosidade) e morfológicas (tamanho e forma do grão/partícula), efetivas no controle antimicrobiano (ARORA, 2010).

No caso de sulfitos, a técnica da encapsulação permite reduzir reações com outros nutrientes, quando eles são usados para prevenir a degradação de vegetais e também controlar mecanismos de

liberação de SO₂. O sucesso para o processo de preparação está relacionado principalmente com o grau de encapsulamento e o material do núcleo (XING et al., 2011).

3.7 LEGISLAÇÃO PARA EMBALAGENS ATIVAS

O uso de substâncias autorizadas para contato com alimentos e o uso de aditivos de grau alimentício, é uma importante alternativa às pesquisas em embalagens ativas (YAMADA, 2004). O agente ativo deve ser classificado como aditivo de embalagem, substância de contato com alimentos ou como ingrediente alimentar (HAN, 2003).

No período de 1999 a 2001, foi realizado, na União Européia, o projeto “Actipak”, com a finalidade de avaliar a segurança, efetividade, impacto econômico-ambiental e aceitação pelo consumidor de embalagens ativas e inteligentes, FAIR-Project PL 98-4170. Obteve-se como resultado o Regulamento CE 1935/2004 do Parlamento Europeu, que permite a utilização de embalagens ativas, admite a migração de substâncias de embalagens e regulamenta o registro destas substâncias, indicando ainda uma rotulagem específica. Todos os novos sistemas de embalagens ativas e inteligentes necessitam avaliação da autoridade européia (JONG et al., 2005).

De acordo com Suppakul et al. (2003b), diversas substâncias receberam autorização do FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em embalagens ativas em contato com alimentos. Na Comunidade Européia, até 2004, a Diretiva 89/109/EEC, que trata da legislação de embalagens de alimentos, estabelecia o limite de 60 mg.kg⁻¹ de substâncias de embalagens totais migradas para o alimento. Isto era impeditivo para embalagens ativas, já que a finalidade das mesmas é liberar a substância adicionada ao material de embalagem (FABECH et al., 2005).

Até 2008, a legislação brasileira não se pronunciava com relação às embalagens ativas, devendo a produção deste material ser considerada juntamente com a lista de aditivos aprovados para uso em alimentos, a legislação de materiais de embalagens, e a migração de substâncias e possíveis contaminantes. Após debates conduzidos por especialistas em embalagens ativas e segurança alimentar, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou no diário Oficial da União (DOU), RDC 17 de 17 de março de 2008, a lista positiva de aditivos para materiais poliméricos destinadas à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos, bem como os limites máximos para cada finalidade, incluindo o bissulfito, considerando

10mg/kg em SO₂ a quantidade máxima de migração da embalagem para o alimento (BRASIL, 2008).

A migração de compostos da embalagem pode comprometer a resistência química e mecânica do material e também acarretar consequências toxicológicas ao consumidor. Os ensaios de migração podem ser realizados utilizando-se o próprio alimento ou então simulantes alimentícios, devido à complexidade destes. Porém os ensaios regulamentados podem não ser adequados para avaliar a forma real como as embalagens vêm sendo utilizadas no contato com alimentos, principalmente para uso doméstico, já que a mesma pode ser ideal para um produto e não ser adequada para outro (MELO, 2007). A definição de legislação pertinente às embalagens ativas e inteligentes é importante para regulamentar o uso destas tecnologias, bem como para informar ao consumidor sobre sua aplicação segura (SOARES, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

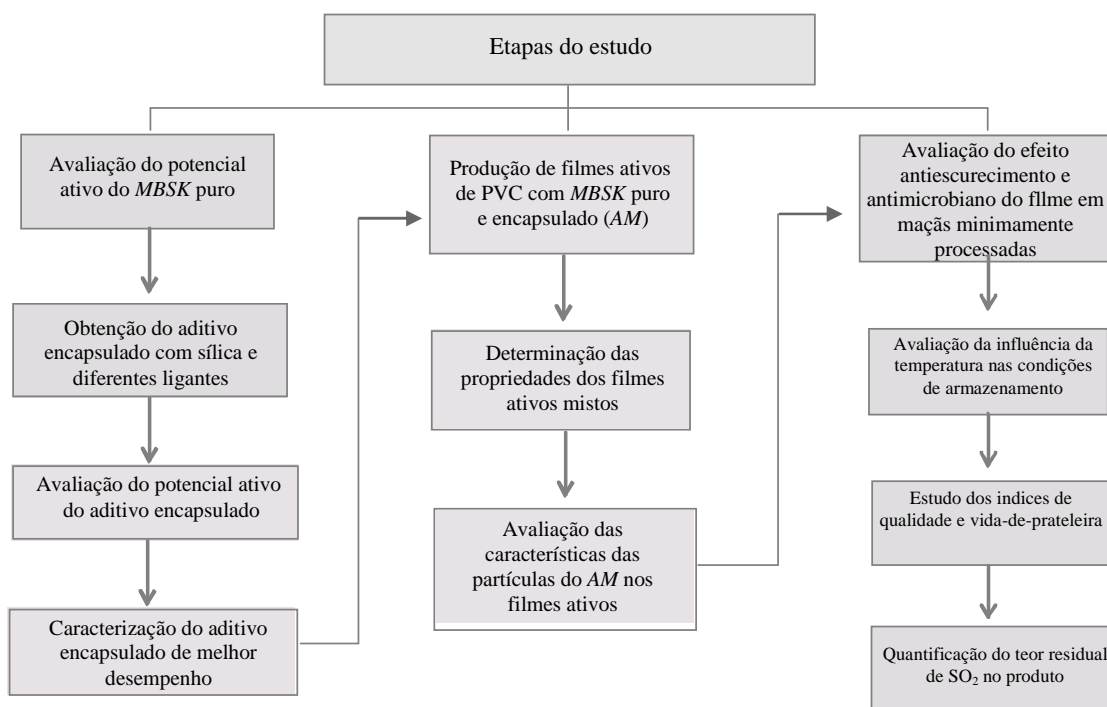
4.1 ASPECTOS GERAIS

Nesse capítulo são apresentados aspectos do planejamento dos experimentos, os materiais e métodos analíticos que foram utilizados, o processo de fabricação dos filmes incluindo as descrições dos procedimentos empregados para a elaboração e caracterização analítica dos filmes, bem como os testes utilizados para medida de eficiência da inativação enzimática e antimicrobiana através do desenvolvimento de embalagens ativas aplicadas a maçã minimamente processada sob três linhas de estudo.

A primeira delas avaliou a ação do aditivo *MBSK* sobre maçãs, quanto às suas potencialidades: antimicrobiana e antiescurecimento. Baseando-se nos resultados obtidos, realizou-se a aplicação na segunda linha de estudo, focada no processo de encapsulação do *MBSK* em diferentes ligantes e avaliação das propriedades antimicrobianas. Em seguida, a caracterização e a incorporação do aditivo misto (*AM*) (*MKE* - encapsulado e *MK* - puro) de melhor desempenho, em filmes de PVC, em diferentes concentrações, através do processo de extrusão industrial, onde foram avaliadas diferentes propriedades do filme para a obtenção de diferentes respostas para as principais características de qualidade de interesse neste estudo.

Com a obtenção do filme, foi possível a pesquisa dentro da terceira linha, focada na aplicação do filme ativo sobre os *VMP*, para a avaliação do processo de migração do agente SO_2 para a superfície dos vegetais e a caracterização do comportamento desta reação quanto à inibição do escurecimento enzimático, inibição do crescimento microbiano e outros parâmetros de qualidade avaliados ao longo do tempo em diferentes temperaturas nas condições de estocagem. A Figura 6 ilustra as três linhas de estudo conduzidas neste trabalho.

Figura 6 - Fluxograma esquemático da abordagem ao estudo da aplicação de embalagem contendo agente ativo em maçãs minimamente processadas.



4.2. ESCOLHA DO ADITIVO ANTIOXIDANTE/ANTIMICROBIANO

O aditivo a base de enxofre foi adquirido comercialmente, considerando as questões legais que norteiam o uso de aditivos em alimentos, perante o órgão FDA - USA (*Food and Drug Administration*), aceito perante a lista positiva de aditivos para materiais poliméricos destinados à elaboração de embalagens em contato com alimentos da ANVISA (BRASIL, 2008). O agente sulfitante (MBSK) utilizado (Sigma–Aldrich) apresenta as seguintes especificações: aparência: pó branco cristalino; pureza: 98%; massa molecular: 222,32 mol; estabilidade térmica: 190 °C; solubilidade em água: 40 a 57%, de acordo com a temperatura.

4.3 DETALHAMENTO DAS METAS PROPOSTAS

4.3.1 Detecção da atividade antimicrobiana– método de difusão em disco

Com o foco na produção de filmes antimicrobianos para acondicionamento de vegetais minimamente processados, foram eleitos micro-organismos com potencial de desenvolvimento para esses alimentos, sendo quatro espécies Gram-positivas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocitogenes* ATCC 19117, *Micrococcus luteus* CCCC M002, quatro Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Escherichia coli* ATCC 25992 e *Salmonella Tiphymurium* ATCC 14028, bem como duas espécies de fungos: *Candida utilis* ATCC 9950 e *Aspergillus niger* ATCC 16404, adquiridas da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro.

a) 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.

b) 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 espectrofotometricamente a 625 nm, denominando-se de suspensão bacteriana.

c) Inoculação e incubação dos micro-organismos

A suspensão contendo a cultura já preparada e diluída em 10⁷ UFC.mL⁻¹ foi utilizada para inocular placas de petri contendo agar Müeller-Hinton (Oxoid-USA), utilizando-se *swab* estéril por

estriamento. O agente ativo foi testado quanto à atividade antimicrobiana através do método de disco-difusão (NCCLS, 2003), com adaptações. Foram aplicados 25 μL da solução teste contendo 300 mg.kg^{-1} de *MBSK* em discos de papel filtro Whatmann 3, estéreis de 9 mm de diâmetro e 250 g.m^{-2} de gramatura. Os discos foram depositados sobre as placas inoculadas que foram incubadas a 36 °C por 18-24 horas. Antibióticos comerciais: ampicilina (10 $\mu\text{g.disco}^{-1}$) e cloranfenicol (30 $\mu\text{g.disco}^{-1}$) 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 antimicrobiano do aditivo, conforme normas NCCLS (2003). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Estudo do Potencial do *MBSK* na inibição da atividade da enzima de escurecimento (Polifenoloxidase –*PPO*)

O aditivo *MBSK* foi testado sobre maçãs minimamente processadas para avaliar ao longo do tempo de reação da superfície exposta, o escurecimento do vegetal. Este estudo foi realizado segundo metodologia descrita por Nogueira (1989) e Simões (2004), com adaptações. Uma massa de aproximadamente 40 g da superfície das maçãs minimamente processadas foi triturada com 120 mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 (zero à 4 °C). O homogeneizado foi centrifugado por 30 min a 1500 rpm. O sobrenadante resultante foi utilizado para avaliar a reação enzimática (extrato enzimático), sendo mantido em banho de gelo.

Em uma alíquota de 1 mL de extrato enzimático foi adicionado 5 mL de tampão fosfato pH 6,0 (0,2 M) e 3 mL de catecol (0,1 M), previamente aquecidos à 30 °C e mantidos em banho-maria. Imediatamente, efetuaram-se as leituras de absorbância a 425 nm, em espectrofotômetro (UV/VIS 1240 Shimadzu) durante 8 minutos de reação, nos tempos zero, 1, 2, 4 e 8 minutos, para avaliar o escurecimento enzimático nos tratamentos estudados, sendo este extrato enzimático considerado o controle positivo.

O mesmo procedimento foi realizado para a amostra em estudo, onde, neste caso o *MBSK* foi adicionado ao extrato. A quantidade de *MBSK* na ordem de 0,03% (p/p) de SO_2 , correspondeu a 0,1042 g.100mL^{-1} de extrato, calculados pela estequiometria da reação de dissociação do aditivo. O percentual de 0,03% (p/p) do SO_2 foi definido com base no limite da legislação para polpas de vegetais (BRASIL, 2005), o mesmo utilizado por Coelho (2008) para metabissulfito de sódio.

A atividade da *PPO* foi expressa em unidade enzimática: U.mL.minuto⁻¹. Uma unidade equivale a uma variação de 0,001 na absorbância por minuto por mL de amostra. Para o cálculo de atividade, utilizou-se a equação proposta por Abreu e Faria (2007) (Equação 1).

$$\text{Atividade (U.mL}^{-1}\text{)} = (AF_{\text{amostra}} - AI_{\text{amostra}}) - (AF_{\text{branco}} - AI_{\text{branco}}) / (0,001 \cdot t)$$

Equação 1

Onde:

AF_{amostra} : absorbância final da amostra; AI_{amostra} : absorbância inicial da amostra; AF_{branco} : absorbância final do controle e AI_{branco} : absorbância inicial do controle e t é o tempo em minutos.

A avaliação da inibição da atividade foi calculada com base na medida indireta, que mostra o percentual da queda da atividade, através das variações da absorbância a 425 nm, de acordo com a Equação (2) utilizada por Iyidogan e Bayindirh (2004) e Luo et al. (2011).

$$\% \text{ de Inibição} = (\Delta Abs_{\text{controle}} - \Delta Abs_{\text{amostra}}) * 100 / \Delta Abs_{\text{controle}}$$

Equação 2

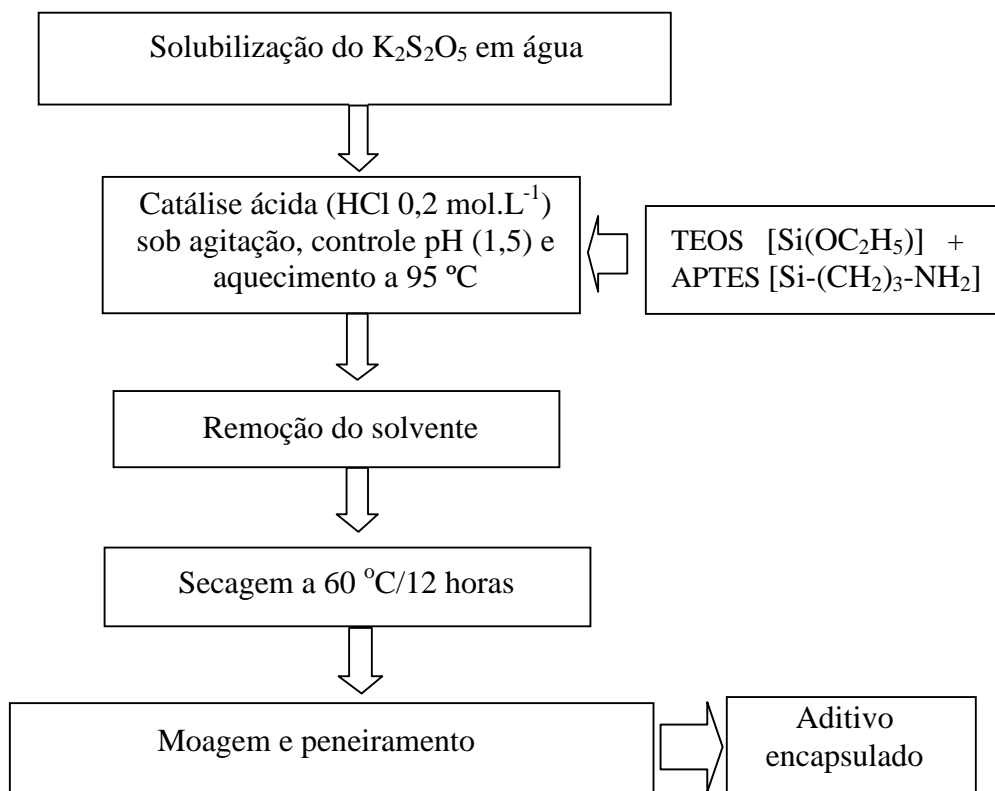
Onde:

ΔAbs representa a diferença do valor de absorbância entre um tempo t (em minutos) e o tempo inicial (t zero).

4.3.3 Obtenção do aditivo *MBSK* encapsulado via método *sol-gel*

O processo de encapsulamento do aditivo foi realizado no laboratório de Catálise Zigler-Natta do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A rota adotada é apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Esquema geral da síntese via encapsulamento por processo *sol-gel*.



O encapsulamento do aditivo (*MK*) foi realizado empregando-se o processo *sol-gel*, a partir de tetraetoxissilano (TEOS, 99% Sigma-Aldrich, Brazil) e aminopropiltrietoxissilano (APTES, 98% Merck, Brazil). As etapas envolvidas nesse processo incluíram a solubilização do *MBSK* em água, adição de compostos TEOS + APTES com reação a 95 °C sob agitação com auxílio de agitador magnético para hidrólise e a condensação, na presença de um catalisador ácido (HCl P.A. 0,2 mol.L⁻¹, 38% Nuclear, Brazil). Após a geleificação completa, seguiram-se as etapas de lavagem com H₂O/etanol na proporção de 2:1 (v/v), secagem a 60 °C, moagem e peneiramento a 400 mesh, foram obtidos os aditivos encapsulados na matriz de sílica contendo a funcionalidade do organossilano empregado. Foram sintetizados os encapsulados em sílica pura com o uso de ligante organossilano aminopropil. Para a obtenção de 1 g de aditivo encapsulado foram utilizadas proporções de: 2,61 mL de TEOS, 0,59 mL de APTES, 0,3 g de *MBSK*, 1,73 mL de HCl (0,2 mol.L⁻¹) e 1,3 mL de H₂O, considerando a densidade e grau de pureza dos reagentes.

4.3.4 Caracterização do aditivo encapsulado

A caracterização da distribuição dos elementos químicos foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDX). A degradação térmica e a quantificação química foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA). O tamanho da partícula e raio de giro por espectroscopia de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) e espectros de absorção do composto na sílica por espectroscopia de reflectância difusa no UV visível (UV-DRS).

As análises de microscopia (MEV-EDX) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura-espectrômetro de energia dispersiva de raios X JEOL, modelo JSM 6060, operando em 20 kiloeletrovolt (kV).

O comportamento térmico do aditivo foi estudado a partir das curvas de degradação térmica, TGA/DTG, com a determinação da perda de massa e composição química do aditivo puro e do encapsulado, nas seguintes condições: amostra (*MBSK*): aproximadamente 10 mg, atmosfera: nitrogênio (fluxo 50.00 mL.min⁻¹), taxa de aquecimento: 12 °C.min⁻¹ e faixa de temperatura de análise: 0 à 800 °C, em equipamento da marca Shimadzu, modelo TGA-5.

O tamanho e forma da partícula do aditivo encapsulado foram analisados por espectroscopia de espalhamento de raios X em baixos ângulos (SAXS) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). Amostras da sílica, do aditivo encapsulado em sílica e da sílica mais o ligante aminopropil, foram acondicionadas perpendicularmente ao feixe de raios-X, em uma célula selada de aço inox com 1 mm de espessura, usando um comprimento de onda de 1,488 nm. O feixe de raios X foi monocromatizado por um monocromador de silício e as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e um pó de behenato de prata foi utilizado como padrão de calibração para a distância detector-amostra, a inclinação e a posição do feixe direto. A análise dos dados foi efetuada utilizando-se a rotina IRENA implementada no software Igor Pro (WaveMetrics, Portland, USA).

Os espectros de absorção (UV-DRS) do aditivo *MK*, *MKE* e do suporte (sílica-NH₂) foram obtidos pelo método de reflectância em um espectrofotômetro Varian Cary 100 UV-vis com acessório de reflectância difusa DRA-CA-301 acoplado, na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, utilizando uma célula de quartzo.

4.3.5 Avaliação do potencial antimicrobiano do aditivo encapsulado

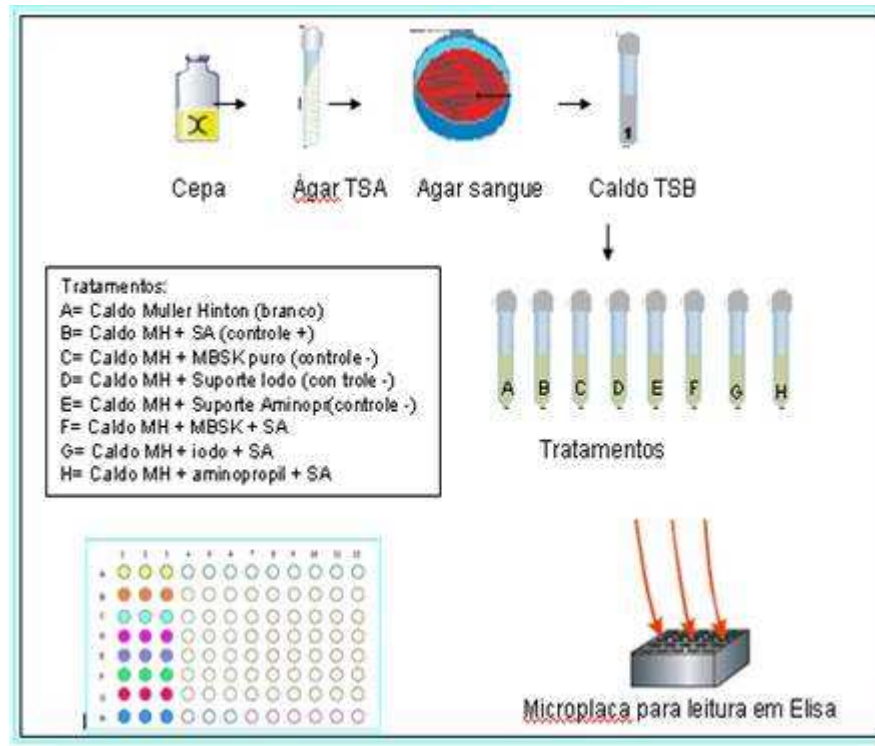
O aditivo *MBSK* encapsulado com a presença dos diferentes ligantes (12 tratamentos) foi testado para avaliar seu potencial antimicrobiano. Esta etapa seguiu os procedimentos já citados em 4.3.1, porém 300 mg.kg⁻¹ (limite da legislação) do *MBSK* foi adicionado diretamente ao centro de cada placa inoculada.

A zona de inibição formada é registrada como uma indicação da inibição das espécies microbianas. O diâmetro da zona de inibição foi medido em milímetros em quadruplicata. A inibição foi considerada: fraca (10-13,9 mm), moderada (14-18 mm) e forte (> 18 mm) de acordo com Carovic-Stanko (2010). Não sendo observada formação da zona de inibição, considerou-se que o aditivo encapsulado não apresentou efeito antimicrobiano. Com este procedimento foi possível definir o aditivo encapsulado que apresentou melhor desempenho na avaliação antimicrobiana (maior zona de inibição) e sua aplicação no estudo da cinética de crescimento microbiano, para comparar o efeito dos aditivos puro e encapsulado como antimicrobianos.

Para o estudo cinético, foram utilizadas cepas de culturas Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25292) e de cultura Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922). As culturas puras foram inicialmente incubadas em ágar sangue, durante 18 horas a 36 °C. O inóculo foi preparado transferindo-se 4 a 6 colônias para o caldo TSB, e este incubado durante 6 horas em estufa a 36 °C. A suspensão foi avaliada em espectrofotômetro a 625 nm de modo a se obter uma turbidez provocada por 10⁸ UFC.mL⁻¹, equivalente ao valor 0,5 da escala de McFarland.

Foram testados diferentes ensaios em triplicata contendo *MBSK* puro e encapsulado a 0,1 % (p/p). Em tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo Mueller-Hinton foram acrescidos os aditivos, sendo em seguida filtrados em membrana filtrante de 45µm para a obtenção de um meio estéril, quando então foram adicionados de 1000 µL do inóculo para a obtenção de uma população microbiana de 10⁷ UFC.mL⁻¹ (NCCLS, 2003). A seguir, 200 µL de cada tratamento foram transferidos em cada orifício da microplaca de 96 cavidades. O crescimento microbiano foi avaliado pela leitura da densidade óptica a 620 nm em leitor de microplacas ELISA (Multikam MS-Labsystem) (Biotek) a 37 °C por 24 h com leituras a cada hora sob agitação contínua. A Figura 8 ilustra o esquema utilizado para o estudo da cinética microbiana de micro-organismos utilizados no teste.

Figura 8 - Estudo da cinética microbiana *Staphylococcus aureus* (SA) através da densidade óptica por ELISA.



Foram calculadas as velocidades específicas de crescimento através de uma representação semilogarítmica da concentração celular em função do tempo. Durante esta fase de crescimento, obtém-se uma reta com coeficiente angular igual a μ_{max} , conforme a Equação 3.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{max} \cdot t$$

Equação 3

Onde:

X = concentração celular UFC.mL⁻¹

X_0 = concentração inicial UFC.mL⁻¹

μ_{max} = velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

t = tempo de cultivo (h)

Da mesma forma foi possível calcular o tempo de geração, no qual segue a Equação 4.

$$t = \ln 2 / \mu_{max}$$

Equação 4

Onde:

t = tempo de geração em horas

μ_{max} = velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

4.3.6 Produção de filmes ativos de PVC com *MBSK* encapsulado

4.3.6.1 Fabricação dos filmes ativos de PVC

Os filmes foram produzidos em três etapas. A primeira foi a preparação do aditivo misto (*AM*), que consistiu de uma mistura de iguais partes de metabissulfito de potássio (*MK*) (P.A. 98%, Sigma–Aldrich) e metabissulfito de potássio encapsulado (*MKE*), obtido por síntese *sol-gel*. A segunda etapa consistiu no preparo das misturas de PVC com diferentes concentrações de *AM*. Foram elaboradas quatro formulações, sendo a primeira contendo 0,1% (p/p) de *AM* em resina de PVC Norvic® SP1000 (BRASKEM, RS), denominada de F01, a segunda e a terceira, contendo 1% e 2% (p/p) de *AM*, sendo denominadas de F1 e F2, respectivamente. Um filme sem adição de *AM* foi produzido como controle (FC). Na terceira etapa foi realizada a extrusão dos filmes, em ordem crescente de concentração do aditivo incorporado, em uma microextrusora AXPlásticos®, modelo AX 16L/D 26 com velocidade de rosca de 200 rpm, com temperatura para a zona 1, de 120 °C, para a zona 2, 140 °C e para a zona 3 de 160 °C, com espessura nominal de 12 micra.

4.3.7 Caracterização das propriedades dos filmes ativos produzidos

4.3.7.1 Composição química e morfológica dos filmes

Foram analisadas a perda de massa em função da temperatura e a quantificação química por análise termogravimétrica (TGA). A distribuição e a caracterização dos elementos químicos foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDX).

As curvas termogravimétricas através das análises de TGA foram obtidas em um analisador Shimadzu®, modelo TGA-5, sob fluxo de nitrogênio com vazão de 50.00 mL.min⁻¹ para as amostras (*MK* e *MKE*): aproximadamente 10 mg, com taxa de aquecimento: 12 °C.min⁻¹ e intervalos de temperatura de 0 °C à 800 °C.

As microscopias das amostras (MEV-EDX) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM 6060, operando em 20 kV.

4.3.7.2 Aspecto visual

Esta avaliação foi utilizada para definir os filmes homogêneos (avaliação quanto à presença de partículas insolúveis e coloração uniforme), que apresentam continuidade (sem a presença de rupturas ou zonas quebradiças) e possibilitem o manuseio (facilidade em retirar os filmes do suporte).

4.3.7.3 Medida de espessura e propriedades mecânicas dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro Mainard® (precisão 0,001 mm; Modelo M 73011). Os valores de espessura foram obtidos através da média de cinco pontos de cada filme produzido. O ensaio foi conduzido em temperatura ambiente a cerca de 20 °C.

Em relação às propriedades mecânicas dos filmes produzidos, foram realizados ensaios de tração, usando-se um medidor de ensaios universal Emic®, modelo DL 500, equipado com uma célula de corpo de prova Trd 21 de 5 KN e velocidade de cabeçote de 5 cm.min⁻¹. Considerando que as propriedades dos filmes e embalagens plásticas podem sofrer alterações significativas com as alterações de temperatura e umidade relativa, foi efetuado o acondicionamento prévio em temperatura de 25±2 °C e 50±2% de umidade relativa após acondicionamento dos corpos de prova em estufa de secagem por 24 horas, conforme norma da ASTM E171-94 (1996) e ASTM D681-95 (1996). Embora a norma sugira cinco repetições de cada amostra para o ensaio de tração, por questão de precisão os ensaios foram repetidos 10 vezes em cada amostra nos sentidos DM, direção de máquina, e DT, direção transversal dos filmes avaliados. Os resultados foram obtidos utilizando-se programa Tesc versão 3.04.

Amostras de 145×25 mm² foram utilizadas como corpos de prova, com distância fixa de 50 mm entre as garras, e velocidade de tração de 50 mm.min⁻¹. Nos testes de tração foram determinados os componentes: força máxima (N), tensão ao escoamento (mPa), tensão na ruptura

(mPa) e alongamento na ruptura (%). Os valores destas propriedades foram calculados segundo as Equações 5, 6 e 7.

$$\text{Tensão no Escoamento (MPa)} = \frac{F_{esc}}{A_{min}} \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Tensão na Ruptura (MPa)} = \frac{F_{rup}}{A_{min}} \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Alongamento na Ruptura (MPa)} = \left(\frac{A_r}{DG} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

F_{esc} = força registrada no ponto de escoamento (N);

F_{rup} = força registrada no ponto de ruptura (N);

A_{min} = área mínima inicial do corpo-de-prova (m^2);

A = área média inicial do corpo-de-prova (m^2);

DG = distância inicial entre as garras (m);

4.3.8 Preparo das maçãs minimamente processadas, envolvimento nos filmes ativos e acompanhamento da vida-de-prateleira

Maçãs da cultivar Gala (*Malus domestica* Borkh) foram adquiridas em mercado local, sendo mantidas sob refrigeração em câmara fria por 12 h a 2 °C, para minimizar alterações fisiológicas. Estas foram pesadas, lavadas com água potável e sanificadas em solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 100 mg.L⁻¹ durante 15 min, seguidas de enxague. Na sequência, foram descascadas e cortadas em fatias de aproximadamente 20 mm² e espessura média de 10 mm.

As amostras foram imediatamente acondicionadas nos filmes ativos (FC, F01, F1 e F2) em porções de aproximadamente 50 g. Estas foram estocadas nas temperaturas de 4 °C, 8 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C em câmara controlada (Estufa BOD Marconi®). Os controles analíticos foram retirados nos tempos: zero (instante em que foram acondicionados), quatro, oito, doze, desesseis e vinte dias de armazenamento. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada parâmetro determinado.

4.3.9 Avaliação de parâmetros de cor dos vegetais ao longo do tempo de estocagem

A determinação dos parâmetros de cor foi realizada através da medida instrumental por colorímetro (Minolta® Color Reader, modelo CR200), com fonte de luz padronizada, usando-se as coordenadas L^* , a^* , b^* , onde o L^* é o croma associado à luminosidade ($L^*=0$ preto, $L^*=100$ branco), a^* é o parâmetro de cor que varia do verde (a^* negativo) ao vermelho (a^* positivo), e a coordenada de cromaticidade b^* , o parâmetro de cor que mede variações de azul (b^* negativo) ao amarelo (b^* positivo). O equipamento foi calibrado com padrão branco e preto (BARACAT, 2006).

Os cortes da fruta foram colocados em superfícies planas, evitando sobreposições, e, foram realizadas as leituras de reflectância diretamente em contato com as amostras. Foram realizadas três leituras por unidade de amostra em pontos diferentes para cada tratamento em triplicata. As leituras foram realizadas ao longo do período de armazenamento. A partir destes dados foram calculadas as diferenças de cor através da Equação 8, a mesma utilizada por Yamashita et al., (2006). Os valores dos parâmetros L^* , a^* , b^* foram convertidos em dados de RGB (intensidade relativa de vermelho (red), verde (green) e azul (blue) que forma uma determinada cor) para o sistema CIELab e CIELCH pelo *software* CIE Color Calculator (LINDBLOOM, 2004).

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Equação 8

Onde Δ é a diferença entre cada parâmetro de cor entre a amostra inicial (tempo zero) e a amostra armazenada.

Da mesma forma foi possível calcular o índice de escurecimento (IE) das maçãs, de acordo com metodologia utilizada por Olivas et al. (2007), calculado a partir da Equação 9, utilizando os parâmetros de cor: L^* , a^* , b^* .

$$IE = [100 (X - 0,31)] / 0,172$$

Sendo:

$$X = (a^* + 1,75.L^*) / [5,645 . L^* + a^* - (3,021.b^*)]$$

Equação 9

Além disso, foi possível calcular o percentual de inibição do escurecimento (Equação 10), comparando-se a amostra controle com a amostra de cada tratamento, conforme Iyidogan e Bayindirh (2004).

$$\% \text{ Inibição} = (\Delta L^* \text{ controle} - \Delta L^* \text{ tratamento}) \times 100 / \Delta L^* \text{ controle}$$

Equação 10

4.3.10 Contagem de micro-organismos psicrotróficos

As amostras acondicionadas foram submetidas à contagem de bactérias psicrotróficas pelo método padrão em placas ao longo do tempo de estocagem nas diferentes temperaturas. Para isso, 25 g de cada amostra foram homogeneizadas assepticamente com 225 mL de água peptonada (Difco® USA) 0,1% em *stomacher* (Marconi®, São Paulo, Brazil) por 2 minutos. Procederam-se as diluições decimais utilizando-se água peptonada e o plaqueamento em superfície utilizando-se 0,1 mL sobre o meio plate count ágar - PCA (Difco® USA) previamente fundido e resfriado a 45 °C em banho-maria (Marconi®), seguido da incubação a 7 °C por 10 dias em estufa BOD (Marconi®). Os resultados foram expressos em ciclos logaritmos ($\log \text{ UFC.g}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata, conforme metodologia proposta pelo “*Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Food* (APHA, 2001).

4.3.11 Cálculo da energia de ativação (E_a) sobre os parâmetros de reação de escurecimento enzimático e da contaminação microbiológica, nas condições de armazenamento.

A equação de Arrhenius (Equação 11) foi usada para avaliar a influência da energia de ativação (E_a) sobre os parâmetros de reação de escurecimento enzimático e de contaminação microbiológica das maçãs minimamente processadas, em cinco diferentes temperaturas.

$$k_{(T)} = k_o \exp \left[\frac{-Ea}{RT} \right]$$

Equação 11

Onde: $k_{(T)}$ representa a constante da taxa de reação para a determinação dos gradientes: índice de escurecimento e contaminação microbiológica do produto em função da temperatura, k_o é a constante pré-exponencial, Ea é a energia de ativação em kcal.mol^{-1} , R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal.gmol}^{-1}.\text{K}$) e T a temperatura em Kelvin.

A energia de ativação é calculada por meio da linearização da equação e obtenção da inclinação da reta, obtido pelo logaritmo da constante de velocidade versus o inverso da temperatura absoluta, cuja inclinação é igual a Equação 12.

$$\text{Inclinação} = \frac{Ea}{R}$$

Equação 12

4.3.12 Determinação de índices de qualidade dos VMP após acondicionamento nos filmes

a) Perda de massa durante estocagem

A perda de massa foi determinada por gravimetria. As embalagens contendo os vegetais em cada tratamento foram pesadas em todos os intervalos do estudo. O resultado foi expresso em percentagem de perda em relação à massa inicial, semelhante ao realizado por Yamashita et al. (2006) e Endo et al. (2006).

b) Determinação de pH

Foi realizada de acordo com o método 943.02 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2006), em potenciômetro digital previamente calibrado (DIGIMED modelo DM20), onde foram pesados 10 g de amostra, adicionados de 100 mL de água destilada (BRASIL,

2005b) e triturados em um agitador (Ultra turrax T18 Basic), procedendo-se em seguida, a leitura à 20 °C (JUNQUEIRA, 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata de amostra.

c) Avaliação da qualidade microbiológica

Como o objetivo de avaliar a inocuidade das maçãs minimamente processadas e considerando a falta de legislação específica para *VMP*, foi avaliada a qualidade microbiológica nos tempos zero e 20 dias de armazenamento, através das análises de *Salmonella* spp e Coliformes à 45 °C, com base na RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001). As análises foram realizadas, de acordo com a Instrução Normativa 62, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003). Os resultados foram expressos em presença ou ausência de salmonela em 25 g e unidades formadoras de colônias por grama (UFC.g⁻¹) para os coliformes termotolerantes. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.13 Detecção da contaminação do alimento por resíduo de sulfito

O residual de SO₂ (mg.kg⁻¹) migrado dos filmes ativos para as amostras de maçãs, nos diferentes tratamentos foi analisado. A análise foi realizada através da titulometria iodométrica, seguindo metodologia adaptada de Araujo (2008).

4.3.14 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados por meio da análise de variância com dois fatores (ANOVA) para estimar efeitos significativos ($p < 0,05$) entre as amostras em resposta as variáveis do processo (tratamento, tempo e temperatura). O teste de Tukey foi utilizado para estimar as diferenças mínimas significativas entre as médias ao nível de 5% de significância. Todas as análises estatísticas e cálculos de média e desvios-padrão foram realizados utilizando-se o *software Statistica* versão 8 (Statsoft).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DO EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DO *MBSK*

Segundo procedimentos descritos nas normas da NCCLS (2003), a sensibilidade de micro-organismos contra uma espécie química deve ser avaliada primeiramente de maneira qualitativa. Assim, para verificar o espectro de ação do *MBSK*, foram testadas diferentes espécies de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes em alimentos de origem animal e/ou vegetal, conforme determinado por portarias e instruções normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e organismos de Segurança Alimentar (BRASIL 2001; BRASIL, 2008). Os resultados de sensibilidade bacteriana são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados dos antibiogramas de bactérias Gram positivas e Gram negativas de importância em alimentos contra *MBSK*.

Micro-organismo	Gram	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	Sensível
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	-
<i>Listeria monocitogenes</i> ATCC 19117	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> CCCDM002	+	Sensível
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	Sensível
<i>Salmonella Tiphymurium</i> ATCC 14028	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	Sensível
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	-	Sensível

Ensaios dos antibiogramas bacterianos conduzidos em triplicata, com duas repetições do experimento. Onde se lê resultado: micro-organismo sensível ao teste; sinal – na mesma coluna: micro-organismo não sensível ao teste.

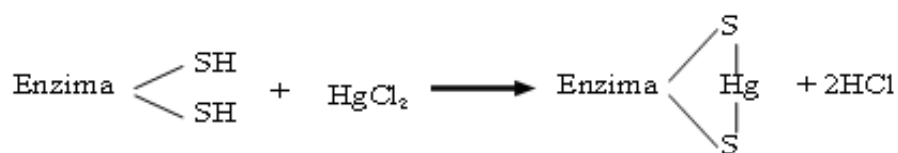
Dentre as espécies de micro-organismos testados, foi detectada sensibilidade de bactérias gram positivas e gram negativas, a saber, respectivamente: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Micrococcus luteus* CCCD M002; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610; *Escherichia coli* ATCC 25922.

O efeito inibitório do *MBSK* ocorre devido a presença dos íons sulfitos sobre o crescimento bacteriano, podendo estes, com o mesmo mecanismo ser encontrado em substâncias como: o SO₂; sulfato ácido de sódio (NaHSO₄), ou bissulfato de sódio (FAN et al., 2009), sulfito e bisulfito de

sódio (Na_2SO_3 ; NaHSO_3), metabissulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) ou de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), sulfito ou bissulfito de potássio (K_2SO_3 , KHSO_3) (WEDZICHA, 1992; EISSA et al., 2006; MACHADO et al., 2006; LU et al., 2007).

Entretanto, um modelo de mecanismo que vem sendo adotado é o descrito por Pelczar et al. (2005), que descreve que os íons ou mesmo elementos puros, como por exemplo, metais dotados de carga negativa, inativam as proteínas celulares, combinando-se com algum componente da célula bacteriana. O ataque ocorre nos grupamentos sulfidríla da extremidade das proteínas, sendo estes ávidos por elétrons. A Figura 9 demonstra a sugestão do mecanismo via reação química do elemento mercúrio – Hg (elétrons) com a superfície dos aminoácidos contidos na camada superficial enzimática das células bacterianas, como similaridade ao mecanismo do grupamento SO_2 do *MBSK*.

Figura 9 - Mecanismo da ação oligodinâmica entre o mercúrio - Hg e enzimas de micro-organismos, à similaridade dos íons sulfitos.



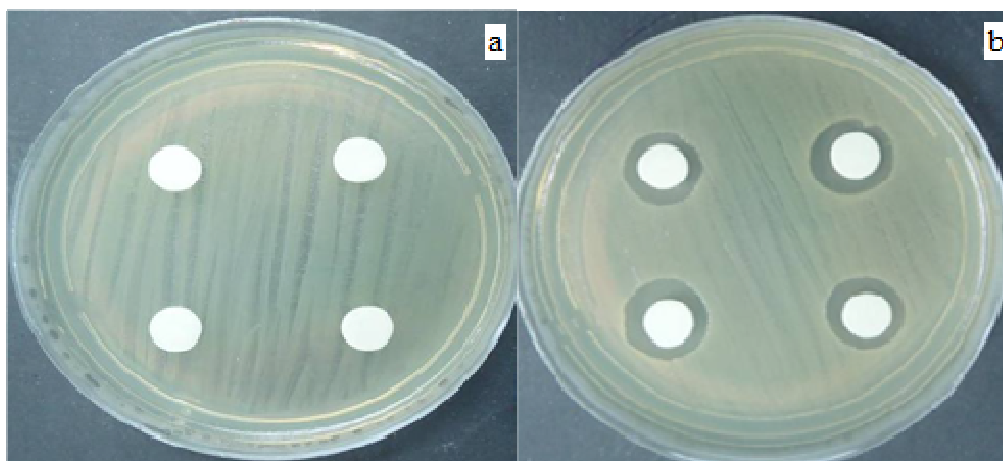
Fonte: Pelczar et al. (2005).

Outra sugestão de modelo de inativação celular microbiana é abordado por Campbell (2002), que discorre a respeito dos mecanismos de inativação enzimática, e sugere que a inativação de enzimas frente aos íons de carga negativa, pode provocar um rearranjo da estrutura espacial, causando uma mudança de configuração. Em mecanismos enzimaticamente dependentes, que é o caso de bactérias, quando uma enzima sofre desnaturação, o metabolismo é rapidamente interrompido, levando à morte do micro-organismo por mecanismo oxidativo ou mesmo por coagulação da proteína central.

Em estudo realizado por Coelho (2008), que avaliou o efeito de diferentes conservantes sobre o crescimento de bactérias e fungos, foi verificado que o metabissulfito de sodio, em baixas concentrações apresentou uma maior eficiência em termos de inibição do crescimento, do que os demais conservantes testados *in vitro*.

Na Figura 10, pode ser visualizado o resultado do teste de atividade antimicrobiana para a cepa de *S. aureus*, onde se pode observar que houve a formação do halo de inibição no antibiograma qualitativo na concentração testada na dose testada de 300 mg.kg^{-1} , podendo este fato ser associado à potencialidade de aplicação deste aditivo juntamente aos filmes. Perante normas de boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos – BPF, a presença bem como a quantidade do gênero *S. aureus* são de grande importância, pois este gênero faz-se presente na maior parte dos casos de toxi-infecções alimentares, uma vez que a fonte mais comum de contaminação por esta espécie é oriunda do homem, principalmente da região nasal e bucal (VANETTI, 2004).

Figura 10 - Resultados dos testes de inativação microbiana qualitativa para o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Incubação (a): sem presença de aditivo; (b) com presença do aditivo (*MBSK* 300 mg.kg^{-1}).



Como se observa na Figura 11, no primeiro caso [a] pode ser observado o crescimento do micro-organismo, sem nenhum efeito inibitório. No segundo caso [b] verifica-se que a presença do *MBSK* nos discos promoveu a formação de um halo de inibição.

Um dos fatores limitantes da vida de prateleira de um alimento está relacionado com micro-organismos pertencentes à classe dos psicrotróficos, dentre os quais o gênero *Micrococcus*, que também apresentou resultado de sensibilidade ao teste, sendo, muitas vezes, indutor e facilitador do crescimento de bactérias lácticas, responsáveis pela conversão da glicose residual da carne em ácido láctico. A formação do ácido láctico, correlacionada ao crescimento de psicrotróficos provoca efeitos indesejáveis na qualidade do produto (FRANCO, 2005).

Em relação aos micro-organismos Gram negativos, verificaram-se efeitos inibitórios para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. Vale ressaltar que a maioria das doenças oriundas de alimentos, são causadas por esta classe de micro-organismos (BOTREL et al., 2007).

O gênero *Pseudomonas*, além de apresentar problemas relacionados à segurança alimentar, são comumente associados à deterioração de alimentos resfriados. De acordo com Botrel et al. (2007), a vida útil dos vegetais refrigerados é principalmente afetada pela população psicotrófica, sendo a *Pseudomonas* sp, o principal psicotrófico presente. Desta maneira, a inativação por *MBSK* torna-se uma boa alternativa no sentido de aumento de vida de prateleira para *VMP*, também para elevação dos níveis de segurança alimentar e em relação à contaminação por espécies deteriorantes.

Com relação a *Y. enterocolitica* ATCC 9610, cada vez mais sua detecção tem se mostrado importante quanto à segurança alimentar. Trata-se de uma bactéria Gram negativa, psicotrófica, com propriedade de se desenvolver a 5 °C, o que permite sua multiplicação em alimentos refrigerados (vegetais crus, leites, carnes e derivados) (LEAL et al., 1997). Esta bactéria é causadora da doença chamada yersiniose, que possui como manifestação clínica mais frequente a enterocolite. Os sintomas variam com as pessoas infectadas, sendo mais comuns em crianças (TEODORO, 2004).

A bactéria *E. coli*, é uma das mais importantes, sendo um micro-organismo indicador de condições de higiene pessoal e manipulação. Diversos estudos apontam a ocorrência deste micro-organismo patogênico em vegetais minimamente processados, associados a distúrbios alimentares (BALAGUÉ et al., 2006). Para os demais micro-organismos testados, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. Tiphymurium* não houve detecção da sensibilidade, sendo estes considerados resistentes ao *MBSK* nas concentrações testadas.

Na Tabela 4, pode ser visualizado o resultado obtido para o teste de sensibilidade do *MBSK* contra duas espécies de fungos de importância em alimentos, principalmente aqueles de origem vegetal.

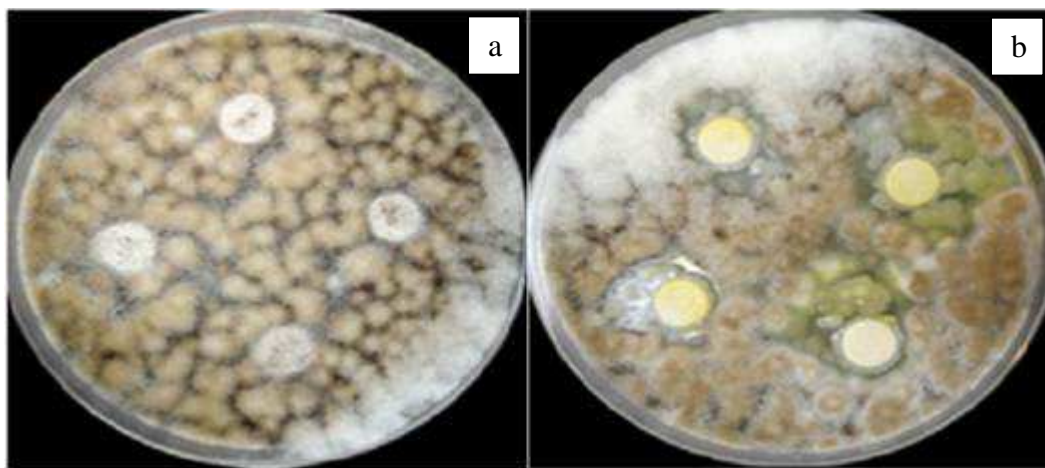
Tabela 4 - Resultados de antibiogramas de fungos de importância em alimentos contra *MBSK*.

Micro-organismo	Resultado
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Sensível

Ensaio dos antibiogramas conduzidos em triplicata, com duas repetições do experimento. Onde se lê resultado: micro-organismo sensível ao teste; sinal – na mesma coluna: micro-organismo não sensível ao teste.

Foi detectada sensibilidade ao aditivo apenas para o *A. niger*, na dose testada de 300 mg.kg^{-1} (Figura 11). Os testes de inativação microbiana, na presença do micro-organismo, indicam que foi observado o crescimento normal do mesmo, na ausência do aditivo e que verificou-se na presença do *MBSK* formação da zona de inibição, observando-se uma menor concentração microbiana próxima aos discos contendo o agente antimicrobiano e uma maior concentração de micro-organismos na periferia da placa.

Figura 11 - Resultados dos testes de inativação microbiana qualitativa para o crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 9950. Incubação (a): sem presença de aditivo; (b) com presença do aditivo (*MBSK* 300 mg.kg^{-1}).

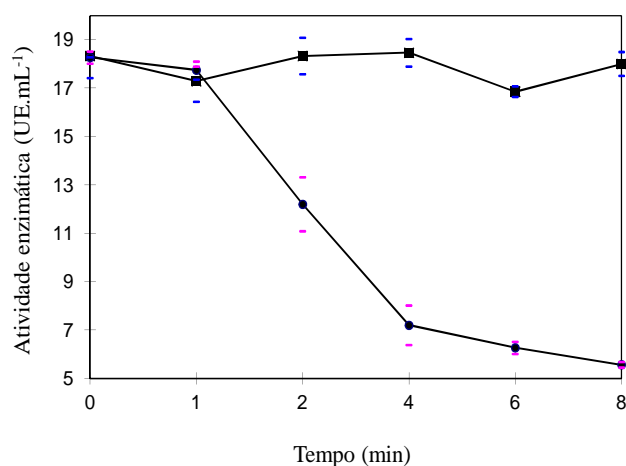


Fungos, em muitos casos, podem apresentar maior resistência frente à inativação química (TOURNAS, 2005). Em estudo realizado por Pereira et al. (2006), filmes antimicrobianos incorporados com natamicina foram avaliados para *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* Houve inativação para todas as espécies testadas, porém, com o aumento da concentração de natamicina houve aumento da eficiência antimicrobiana e o *Penicillium roqueforti* apresentou maior susceptibilidade.

5.2 RESULTADOS DO EFEITO DO *MBSK* NA INIBIÇÃO DA ENZIMA *PPO*

Os extratos de maçãs tratados com aditivo indicaram a ocorrência de efeito inibitório da enzima *PPO*, em comparação com o controle, conforme mostra a Figura 12, uma vez que foi possível observar uma diminuição da atividade enzimática com a adição do aditivo *MBSK*.

Figura 12 - Atividade enzimática da polifenoloxidase (*PPO*) dos extratos testados durante reação de escurecimento enzimático.



(■): Valor médio do extrato de maçã + tampão (controle positivo);
 (●): Valor médio do extrato de maçã + *MBSK* (300 mg.kg⁻¹).
 Média de três repetições. Variação ± desvio padrão.

A inibição da *PPO*, vista nos extratos, pode ser confirmada através do cálculo de inibição (Equação 2), onde estima-se o percentual de inibição da atividade enzimática, verificando-se que a adição de 300 mg.kg⁻¹ de *MBSK* reduziu em 80,15% a atividade da *PPO*, no tempo de 8 minutos. Pode-se considerar que o *MBSK* apresentou efetividade em relação à diminuição do escurecimento enzimático, devido a sua habilidade em reduzir *o*-quinonas geradas por enzimas, associada à redução da atividade enzimática destas, retornando-as ao composto fenólico de origem, antes que as enzimas possam iniciar reações formadoras de pigmentos.

Nogueira e Silva (1989) utilizaram como método de inativação das enzimas *PPO* e *POD* a

adição de *MBSK* 0,05%, 0,1% e 0,2% em superfícies cortadas de maçãs e os resultados apontaram o *MBSK* mais eficiente com 100% da inibição da atividade da *PPO*, já na menor concentração utilizada (0,05%) e 80% de inibição da atividade da *POD*. Crumiére (2000) aponta que uma percentagem de 0 e 100% indica que o tratamento foi efetivo como inibidor do escurecimento.

5.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ADITIVO *MBSK* ANTIOXIDANTE/ANTIMICROBIANO ENCAPSULADO COM DIFERENTES ELEMENTOS LIGANTES

Foi possível sintetizar o *MBSK* encapsulado em condições ambientais, via método *sol-gel* em sílica inerte com 12 diferentes elementos ligantes, a saber: C0, C1, C8, C18, fenil, vinil, aminopropil, mercaptopropil, iodopropil, cloropropil, isocianato e glicóxido. Porém, somente o ligante aminopropil apresentou potencial antimicrobiano satisfatório, conforme será discutido em 5.4. Sendo assim, foi realizada somente a caracterização química e morfológica para o *MK* e para o *MKE* com o radical ligante aminopropil [Si-(CH₂)₃-NH₂], abreviado por (Si-NH₂), conforme será apresentado.

5.3.1 Resultados das análises termogravimétricas para o aditivo puro (*MK*) e encapsulado (*MKE*) com aminopropil

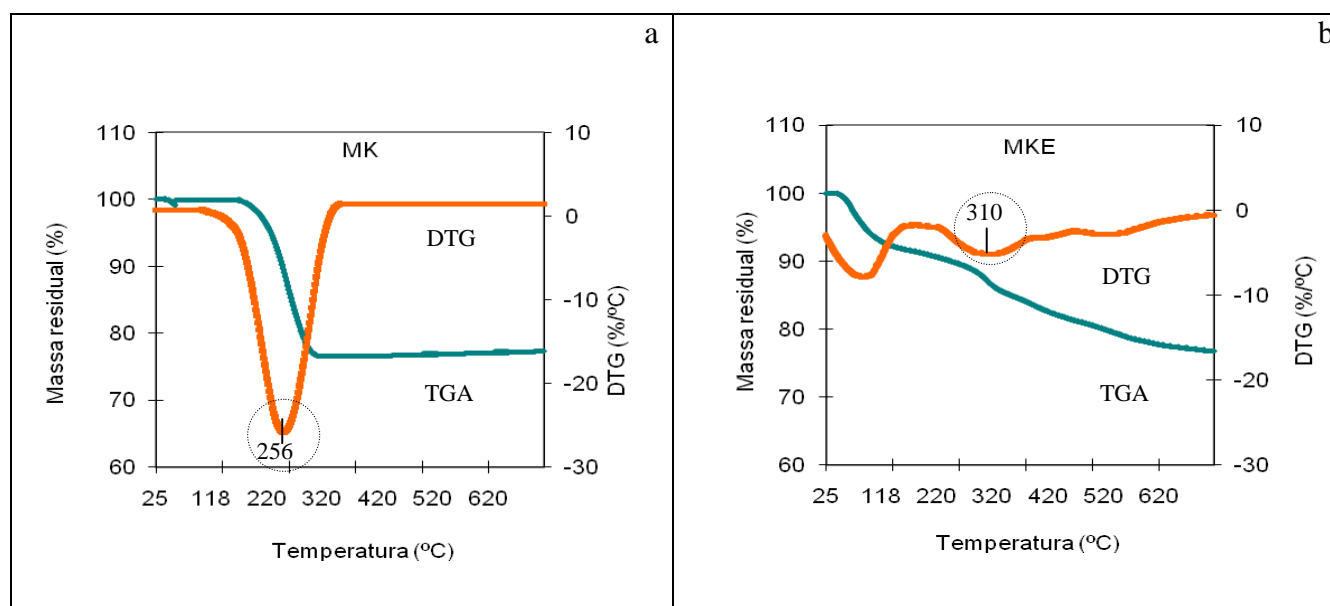
Com intuito de investigar a influência da encapsulação na resistência térmica dos materiais, foram obtidas as curvas termogravimétricas que representam as perdas de massa (TGA) associadas à derivada da temperatura de degradação máxima (DTG) dos aditivos puro (*MK*) e encapsulado (*MKE*), durante o aquecimento térmico, mostradas na Figura 13.

Graficando-se os valores referentes às derivadas das curvas de TGAs dos aditivos obtêm-se os valores dos pontos máximos de cada pico, o qual equivale à temperatura de degradação máxima (T_{max}). Para o aditivo puro (*MK*) (Figura 13a), observa-se apenas um evento de decomposição, correspondendo à degradação do aditivo puro. Analizando a curva termogravimétrica e com auxílio de sua derivada, nota-se que a massa de *MK* mantém-se constante até aproximadamente 200 °C, onde a partir dessa temperatura observa-se o início da degradação do aditivo e na medida

em que ocorre o aumento da temperatura, ocorre a perda de massa. A derivada da TGA obtida para *MK* (a) indicou um pico de degradação máxima em 256 °C com 12,4% de perda de massa (Tabela 5).

Já a derivada obtida para o *MKE* (Figura 13b), indicou dois eventos de degradação. O primeiro estágio de degradação no intervalo de temperatura entre 25 °C e 118 °C, com pico máximo na região de 68 °C, com perda de massa de 5,2% correspondente ao resíduo de água/etanol resultantes do processo de encapsulamento. Resultado semelhante foi obtido por Oliveira (2008b), em filme de PVC, encontrando o primeiro pico a 74 °C. O segundo estágio de perda de massa, atribuído à degradação do aditivo, é observado em intervalo de temperatura entre 220 °C a 330 °C, com pico de degradação máxima em 310 °C, acarretando uma perda de massa de 10,8%.

Figura 13 – Curvas termogravimétricas (TGA) e derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) para os aditivos *MK* (a) e *MKE* (b).



Através destes termogramas é possível afirmar que o material encapsulado gerou uma mudança nas propriedades térmicas. Os resultados apontam um aumento da estabilidade térmica do *MKE*, deslocando o início da degradação para temperaturas mais elevadas, no caso para 310 °C, uma diferença em relação a temperatura de degradação do *MK* na ordem de 53,7 °C, associada a menores perdas de massa, já que a massa fica retida no interior do encapsulante. Os resultados obtidos são importantes à medida que indicam o limite máximo da temperatura de processo ou

manufatura térmica dos materiais, a fim de não provocar sua degradação durante a extrusão, permitindo maior preservação das características do aditivo.

Tabela 5 - Temperatura na qual a taxa de degradação é máxima (T_{max}), obtida pela análise de DTG e percentual de perda de massa referente a T_{max} para os aditivos *MK* e *MKE*.

Aditivo	T_{max} (°C)	Perda de massa (%)
<i>MK</i>	256,1	12,4
<i>MKE</i>	309,8	10,8

5.3.2 Resultados das análises de SAXS

O espalhamento de raios-X a baixos ângulos é uma técnica que possui potencial para o estudo das propriedades estruturais das partículas fractais, através da análise do perfil de intensidade de espalhamento de raios-X e tem sido aplicada com sucesso para a investigação da forma e tamanho de partículas. Esse perfil é dependente tanto do tamanho quanto da forma das partículas, como do modo que se agregam para formar o sólido (DUBEK, 2005). Neste procedimento, a curva de espalhamento é ajustada pela utilização de níveis em regiões que permitem estimativas do raio de giro (R_g), e uma região linear que permite a avaliação de detalhes sobre a organização do material através dos coeficientes angulares (α) (CAPELETTI, 2010). Fractais de superfície possuem expoente de inclinação angular α , variando de 3, quando a superfície da partícula é totalmente rugosa, a 4 quando uma superfície lisa é observada (WEIDLER et al., 1998; BRAMBILLA, 2007).

A análise foi realizada para o aditivo encapsulado em sílica e ligante aminopropil. Os resultados revelaram que o raio de giro (R_g) das partículas primárias de (*MKE*) apresentou um tamanho de 0,797 nm com forma esférica lisa. Essas partículas se organizam num agregado maior, de 11,62 nm com formato de um fractal de superfície, caracterizado como partículas de núcleos densos com superfícies rugosas. O fractal de superfície apresentou uma inclinação α de 3,79, mostrando que essa superfície é um pouco rugosa, o que permite uma liberação mais lenta do aditivo encapsulado para o alimento, pois aumenta a superfície do contato reacional. Ainda, esses agregados se organizaram numa outra estrutura hierarquicamente maior, por sua vez mais rugosa

ainda, com inclinação α de 3,13, o que permite um aumento da energia cinética nas reações de liberação controlada do aditivo. É importante também conhecer o tamanho da partícula, pois esta influencia nas propriedades mecânicas dos filmes, já que um menor tamanho leva a uma distribuição mais homogênea das partículas na matriz polimérica (RÉ, 2000).

5.3.3 Resultados da análise de MEV-EDX do *MKE* e espectro de DRS na região UV-visível

A análise por microscopia eletrônica de varredura é largamente utilizada na caracterização de materiais do ponto de vista morfológico e estequiométrico, este último, através da técnica de EDX para verificar a composição da matriz de sílica, bem como os demais elementos encontrados. É um dos mais importantes instrumentos para a análise química e morfológica de materiais orgânicos e inorgânicos. É uma técnica não destrutiva, onde os raios emitidos pela amostra são convertidos em cargas elétricas para a identificação da energia dos raios-X e conseqüentemente dos respectivos elementos presentes na amostra (CAPELETTI, 2010).

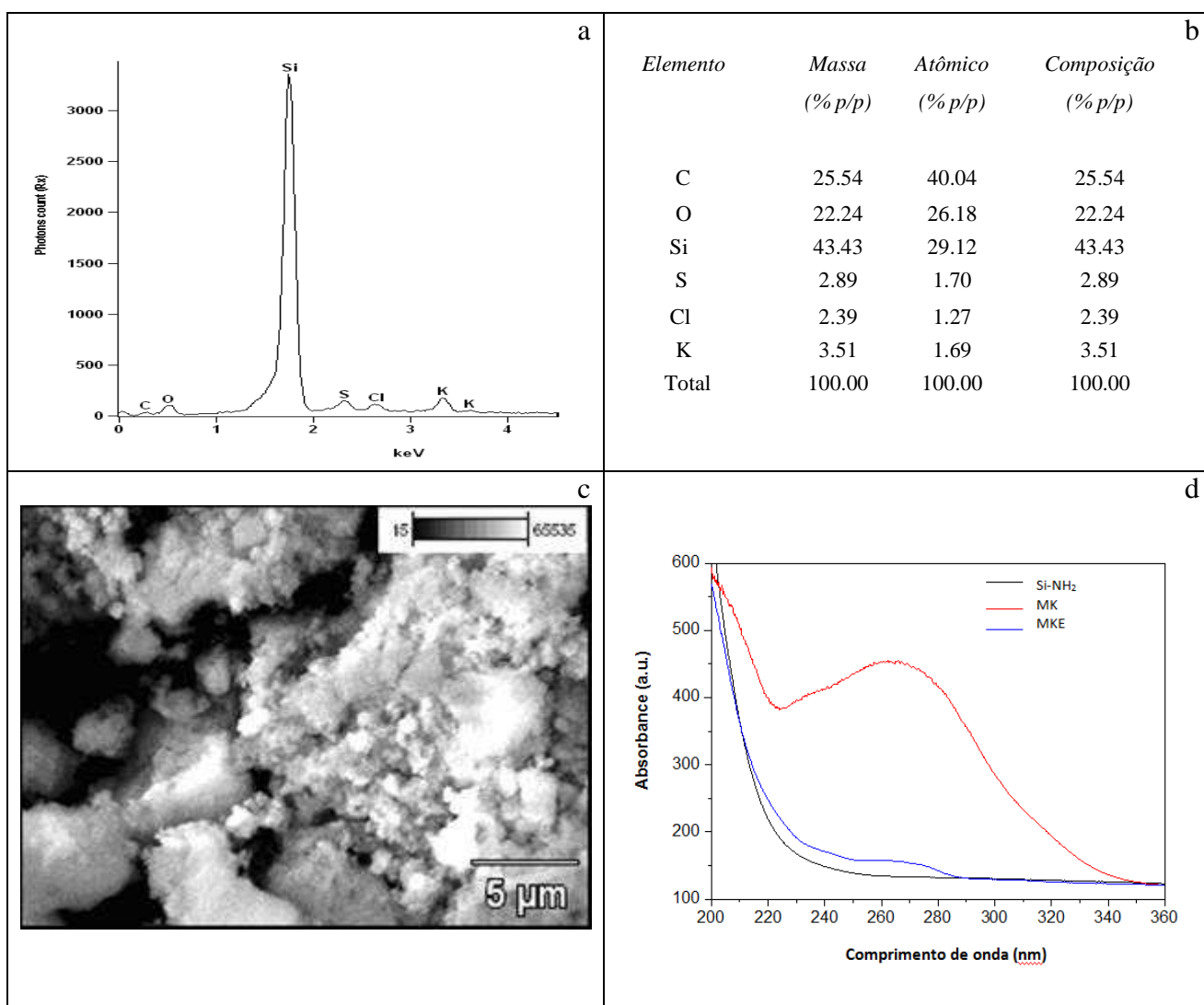
Assim, a amostra de *MKE* foi analisada para verificar sua composição e distribuição na matriz de sílica e ligante aminopropil (Si-NH₂). A Figura 14 apresenta o perfil dos elementos que compõem o aditivo *MKE*, obtido pela análise de MEV-EDX (a); a composição de cada elemento presente no aditivo *MKE* (b), as características morfológicas do *MKE* (c) e os espectros de absorvância na região UV-visível por DRS para o *MK*, *MKE* e o suporte Si-NH₂ (d).

Os espectros de EDX (Figura 14a) permitem visualizar os picos de todos os elementos químicos presentes (C, O, Si, S, K e Cl) na amostra e sua distribuição associada à composição proximal. A análise do mapeamento químico (Figura 14b) mostra os percentuais dos elementos como concentração atômica e concentração em massa. A composição revelou 2,89% de S, 3,51% de K, representando o aditivo *MBSK* e 25,5% de C, representando a matéria orgânica presente. Verifica-se a predominância do Si, encontrado em maior concentração (43,43%), com o maior pico, já que a matriz utilizada no processo de encapsulação foi sílica e o Cl (2,39%), resíduo do catalisador HCl.

A imagem de MEV (Figura 14c) revela a diferença de dimensões entre as partículas, irregularidades, rugosidade, falhas, com formação de aglomerados pouco organizados. Xing et al., (2011) realizaram a encapsulação de sulfito solúvel em água, com etilcelulose para separação de

fases e avaliaram uma morfologia lisa da superfície das microcápsulas e pequenos orifícios existentes na superfície, diferente do observado neste trabalho.

Figura 14 - (a) Espectro da dispersão de energia EDX do aditivo encapsulado, considerando a contagem de fótons que chega ao detector e kiloeletrôvont; (b) composição dos elementos encontrados por EDX para o *MKE*; (c) resultados da análise morfológica de superfície do aditivo *MKE* e (d) espectro de DRS no UV-vis (200-360 nm) para o *MK*, *MKE* e *Si-NH₂*.



Os espectros de absorção do composto na sílica por espectroscopia de reflectância difusa no UV visível (UV-DRS) (Figura 14-d) medem as transmissões eletrônicas, com a mudança estrutural pelo deslocamento de bandas e tem a finalidade de comparar os picos característicos dos compostos, no caso as diferentes bandas entre o *MK*, do *MKE* e do *Si-NH₂*. Foi possível observar que o pico do *MK* diferencia-se do pico do *MKE* e do pico emitido para o suporte (*Si-NH₂*), que

por sua vez apresentaram bandas próximas. Vale destacar a banda formada no comprimento de onda de 270 nm, onde o *MK* e o *MKE* apresentaram picos distintos, enquanto o suporte Si-NH₂ não apresentou pico significativo aparente.

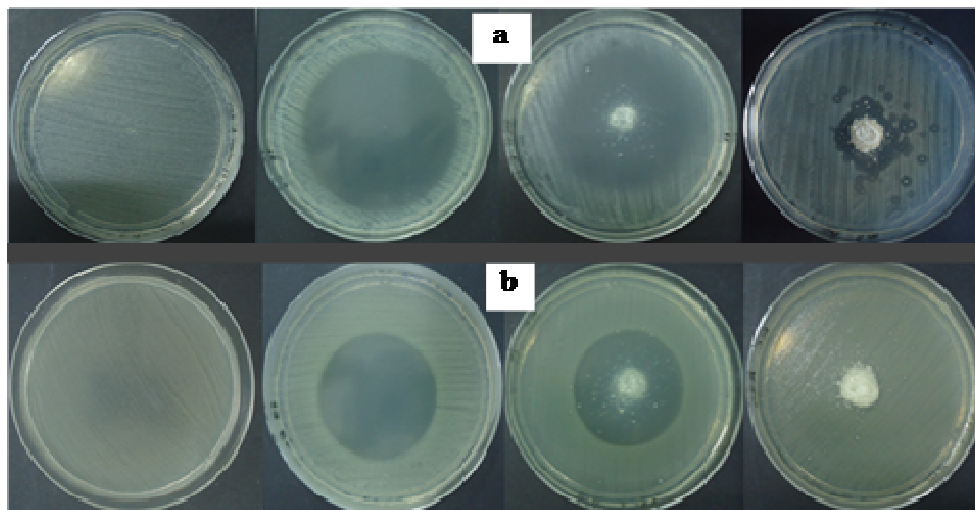
A análise elementar de EDX, revelou que as espécies químicas contidas no sal *MK*, comportam-se de forma muito diferente das espécies químicas contidas no *MKE*, e também no suporte (Si-NH₂) onde o mesmo foi encapsulado, o que resultou em leitura de diferentes reflectâncias entre as amostras. As maiores reflectâncias foram obtidas para o *MK*, indicando duas bandas (parte orgânica e inorgânica) em comprimento de onda entre 230 a 350 nm.

O fato de ter havido formação de bandas muito próximas entre o *MKE* e o Si-NH₂ pode indicar que o organossilano (Si-NH₂) não sofreu alteração estrutural, sugerindo uma interação do composto com a sílica quando nele foram agregado os grupos sulfitos, resultando no *MKE*. Os resultados indicam que a estrutura ativa do aditivo encapsulado está preservada, ou seja, o mesmo poderá reagir e liberar os compostos necessários para o alimento.

5.4 ESTUDOS DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA O ADITIVO ENCAPSULADO (*MKE*) COM DIFERENTES ELEMENTOS LIGANTES SOBRE MICRO-ORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA EM VEGETAIS MINIMAMENTE PROCESSADOS (*VMP*)

Foi realizada a avaliação do efeito antimicrobiano para verificar a ação inibitória dos materiais encapsulados frente aos dois micro-organismos de importância (*E. coli* e *S. aureus*). Verificou-se que dos 12 materiais testados, obtidos com diferentes radicais ligantes na superfície (*R*₁-*MK*, *R*₂-*MK*...*R*₁₂-*MK*), apenas o aminopropil apresentou resultado satisfatório. Para os demais ligantes não foi verificada a formação do halo de inibição característico da atividade antimicrobiana. Na Figura 15 e na Tabela 7, é possível visualizar o efeito inibitório do aditivo contendo ligante aminopropil sobre bactérias: Gram negativa (*E. coli*) e Gram positiva (*S. aureus*).

Figura 15 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana do aditivo puro e encapsulado com ligante aminopropil. Na primeira linha (a) os resultados para *S. aureus*, sendo da esquerda para a direita respectivamente: Controle positivo, *MK* (aditivo puro); *AM* (aditivo misto: puro + encapsulado Si-NH₂); *MKE* (aditivo encapsulado). Na segunda linha, (b) os mesmos resultados tratamentos, porém para *E. coli*.



Coelho (2008) avaliou o efeito de diferentes conservantes no crescimento in vitro de fungos e bactérias e verificou que o metabissulfito de sódio, em menores concentrações, apresentou a maior eficiência em termos de inibição de crescimento que os demais conservantes testados: benzoato de sódio e sorbato de potássio. A Tabela 6 apresenta para estes mesmos resultados o efeito inibitório do aditivo através da formação do halo de inibição e medida quantitativa em milímetros.

Pode ser observado (Figura 15), o efeito antimicrobiano para as espécies testadas. O teste contendo somente o aditivo puro apresentou maior efeito, com forte atividade antimicrobiana, com diferença significativa ($p < 0,05$), tanto para *S. aureus*, bem como para *E. coli*, seguido do aditivo misto, que apresentou forte atividade para *S. aureus* e moderada para *E. coli* e por último o teste contendo somente o aditivo encapsulado em aminopropil, que apresentou efeito inibitório fraco. O aditivo *MKE* não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre as espécies testadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana (zonas de inibição) dos aditivos *MK*, *AM*, *MKE* e controle positivo para *S. aureus* e *E. coli* em diferentes tratamentos.

Tratamentos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	diâmetro (mm)*	diâmetro (mm)*
Controle positivo (sem aditivo)	-	-
<i>MK</i> (aditivo puro)	50,59 ± 0,41 ^{aA}	37,40 ± 0,46 ^{aB}
<i>AM</i> (aditivo misto: puro + encapsulado)	36,22 ± 0,18 ^{bB}	18,98 ± 0,07 ^{bC}
<i>MKE</i> (aditivo encapsulado)	7,28 ± 0,04 ^{cD}	2,51 ± 0,08 ^{cD}

(-) Não há formação da zona de inibição

* Média de quatro repetições.

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) no teste de Tukey a 5% de significância.

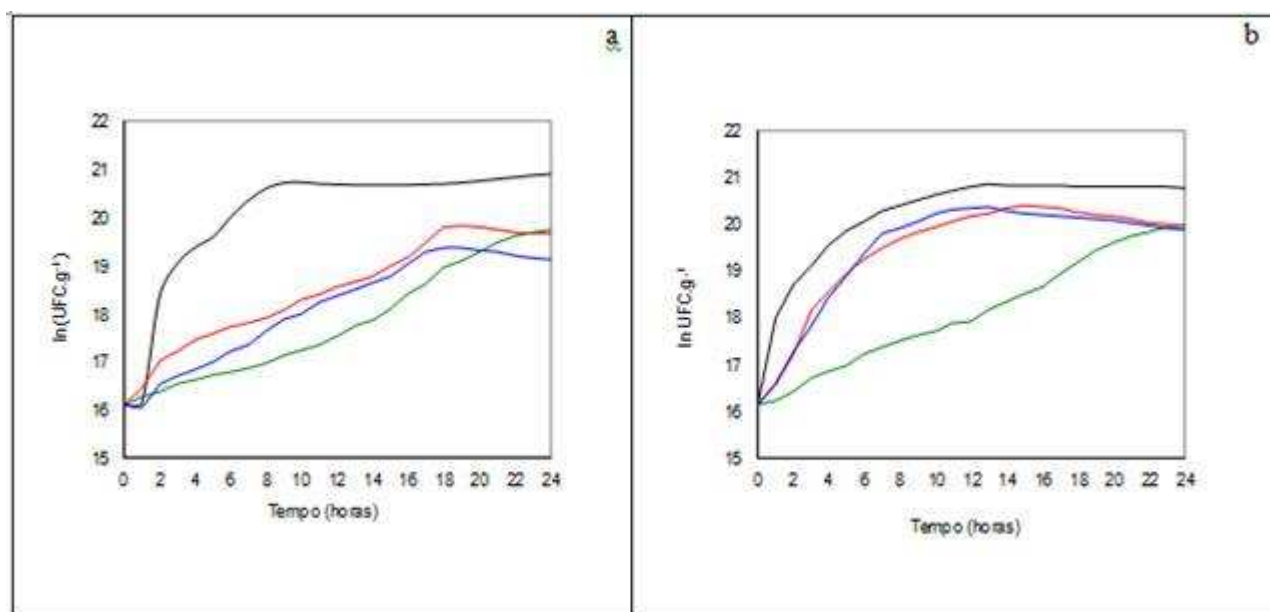
Da classe dos micro-organismos Gram positivos, o gênero *S. aureus* usualmente se encontra na literatura como sendo o de maior sensibilidade às substâncias antimicrobianas destinadas à aplicação em alimentos, como mostra este estudo. Pranoto, Rakshit e Salokhe (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de filmes incorporados com nisina e sorbato de potássio contra Gram positivos e Gram negativos e os autores observaram a formação de halo de inibição apenas para *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Com relação ao estudo da cinética microbiana, diversos parâmetros têm sido usados para caracterizar o crescimento microbiano em alimentos. A Figura 16 apresenta as curvas de crescimento com representação semilogarítmica da ação de *MBSK* puro, encapsulado em suporte aminopropil e misto (50% puro e 50% encapsulado) sobre *S.aureus* (a) em função do tempo de cultivo e 16b sobre *E. coli* (b).

A Figura 16a indica que o aditivo puro (*MK*) apresentou forte inibição do crescimento ao longo do tempo de cultivo, seguido do aditivo misto (*AM*) e do aditivo encapsulado com Si-NH₂ (*MKE*). Mesmo assim, estes três tratamentos apresentaram comportamentos semelhantes, atingindo a fase estacionária com mais de 16 horas de cultivo. Já o controle positivo, com cerca de 8 horas, se encontrava em fase estacionária, com significativo crescimento ($>20 \ln \text{UFC.g}^{-1}$). Os tratamentos contendo o aditivo encapsulado apresentaram redução do crescimento mais ao final do ciclo, onde pode ser observado um declínio, a partir das 18 horas de cultivo (Figura 16). Isso é justificado pelo fato de que o aditivo encapsulado ser liberado gradativamente, podendo potencializar o controle do micro-organismo no momento em que o aditivo puro não apresentar

mais atividade, já que sua inibição pode ser mais bem observada no início do ciclo de crescimento, especialmente na fase logarítmica.

Figura 16 - (a) Curvas de crescimento com representação semilogarítmica da ação de *MBSK* puro, encapsulado em suporte aminopropil e misto (50% puro e 50% encapsulado) sobre *S. aureus* em função do tempo de cultivo. Média de três repetições. (b) Curvas de crescimento nas mesmas condições sobre *E. coli*.



Onde: (—) Controle positivo; (---) *MKE* (aditivo encapsulado em Si-NH₂); (---) *MK* (aditivo puro); (---) *AM* (aditivo misto).

Com relação ao estudo sobre *E. coli*, a Figura 16b apresenta as curvas de crescimento com representação semilogarítmica em função do tempo de cultivo. Comportamento semelhante ao observado para *S. aureus*, onde se verificou que o tratamento controle apresentou maior crescimento e o aditivo puro o que mais inibiu o crescimento. Os tratamentos contendo aditivo misto (*AM*) ou somente encapsulado (*MKE*) apresentaram resultados muito próximos. Da mesma forma, a Figura 16b mostra que os tratamentos contendo o aditivo encapsulado apresentaram redução do crescimento mais ao final do ciclo. A partir das 14 horas de cultivo, é possível observar uma inibição do crescimento para os tratamentos contendo o aditivo encapsulado. Assim, a liberação lenta e controlada ao longo do tempo, por meio do aditivo encapsulado (*MKE*), combinada com o aditivo puro (*MK*) pode potencializar ainda mais o efeito inibitório desta espécie química, já que o primeiro poderá atuar com maior eficiência ao final do período de armazenamento, controlando o ciclo de crescimento e prolongando ainda mais a vida de prateleira.

Em contrapartida, o aditivo puro (*MK*) apresenta-se mais ativo no início do ciclo de crescimento, podendo prolongar a fase lag, acarretando em uma maior extensão da vida de prateleira.

Já a Tabela 7, apresenta os resultados da cinética de crescimento de *S. aureus* incluindo as curvas ajustadas da equação da reta, velocidade específica máxima e tempo de geração para avaliar o efeito dos diferentes aditivos sobre o crescimento do micro-organismo.

Tabela 7 - Resultados da cinética de crescimento de *S. aureus* incluindo as curvas ajustadas da equação da reta, velocidade específica máxima e tempo de geração para avaliar o efeito dos diferentes aditivos (*MKE*, *MK* e *AM*) sobre o crescimento do micro-organismo.

Tratamento	Equação da reta $f(x)=$	R^2	Veloc. espec. max ($\mu_{max}.h^{-1}$)	Tempo geração (min.)
Controle positivo	$1,484\ln(x)+ 16,619$	0,8537	1,4842	28,01
<i>MKE</i>	$1,287\ln(x)+ 15,495$	0,9299	1,2870	32,30
<i>MK</i>	$1,257\ln(x)+ 14,894$	0,7603	1,2570	33,08
<i>AM</i>	$1,276\ln(x)+ 15,166$	0,9096	1,2755	32,60

A velocidade específica de crescimento para o tratamento contendo aditivo puro foi menor ($1,257 \mu_{max}.h^{-1}$), associado ao tempo de geração do micro-organismo (33,08 min), que neste caso foi o maior entre os tratamentos, o que indica que mais uma vez o *MBSK* puro apresentou o melhor efeito inibitório. A Tabela 8 apresenta os resultados da cinética de crescimento de *E. coli*, incluindo os mesmos parâmetros, para avaliar o efeito dos diferentes aditivos sobre o crescimento do micro-organismo.

Com relação à velocidade específica e tempo de geração, o *MK*, *AM* e *MKE* apresentaram os melhores resultados, retardando o crescimento, com velocidades de crescimento menores e tempos de geração mais longos, pela dificuldade dos micro-organismos crescerem nestas condições. Diversos autores sugerem tempos de geração mais curtos para a *E. coli*, em comparação com *S.aureus* (VANETTI, 2004). Neste estudo, estes valores foram próximos: 28.01 e 27.05 min, respectivamente para *S. aureus* e *E. coli* no teste controle, sendo aumentando mais expressivamente nos outros tratamentos.

Tabela 8 - Resultados da cinética de crescimento de *E coli* incluindo as curvas ajustadas com a equação da reta, velocidade específica máxima e tempo de geração para avaliar o efeito dos diferentes aditivos (*MKE*, *MK* e *AM*) sobre o crescimento do micro-organismo.

Tratamento	Equação da reta $f(x)=$	R^2	Veloc. espec. max. ($\mu\text{max.h}^{-1}$)	Tempo geração (min.)
Controle positivo	$1,5371\text{Ln}(x) + 17,336$	0,8985	1,537	27,05
<i>MKE</i>	$1,3740\text{Ln}(x) + 16,256$	0,8955	1,3740	30,26
<i>MK</i>	$1,3515\text{Ln}(x) + 14,966$	0,8472	1,3515	30,76
<i>AM</i>	$1,3546\text{Ln}(x) + 16,310$	0,8426	1,3546	30,70

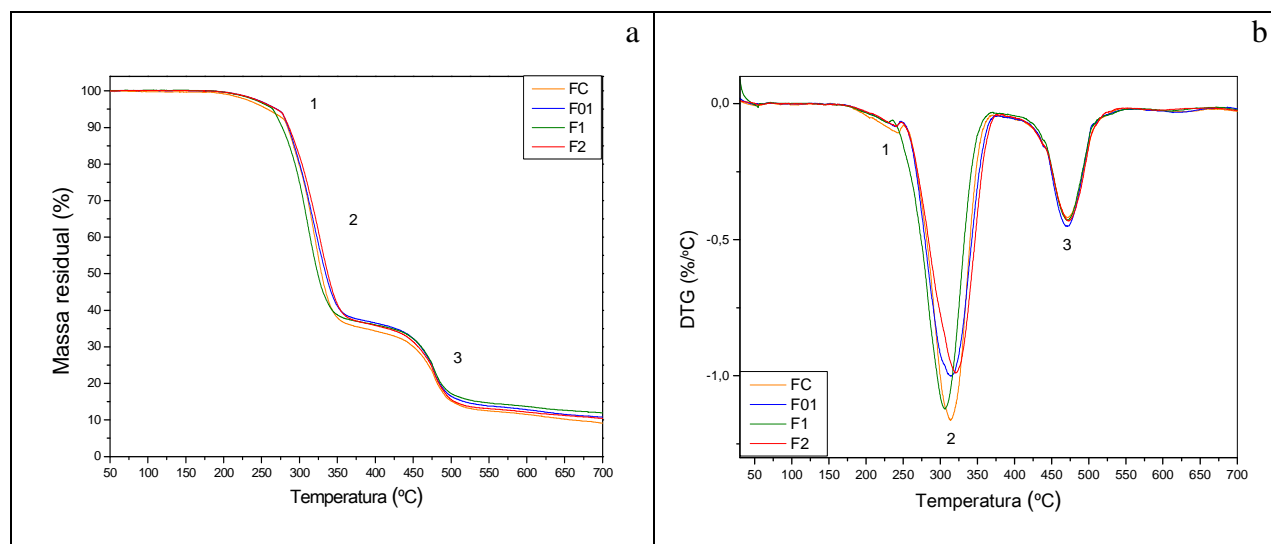
5.5 AVALIAÇÕES DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS, MECÂNICAS E QUÍMICAS DOS FILMES ELABORADOS

De modo geral, os filmes elaborados em todas as concentrações, apresentaram-se transparentes e homogêneos, com características de flexibilidade e elasticidade visualmente semelhantes aos filmes comerciais e ao filme controle (sem adição de aditivo). Através da análise visual dos filmes foi possível verificar a ausência de partículas insolúveis nos filmes FC e F01, porém nos filmes F1 e F2, algumas partículas insolúveis foram verificadas. Mesmo assim, os filmes testados não apresentaram rupturas ou zonas de quebra e apresentaram facilidade no manuseio.

5.5.1 Resultados das análises térmicas dos filmes

A Figura 17 ilustra as curvas termogravimétricas (TGA) (a) e derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) (b) dos filmes durante a histórica térmica nas temperaturas entre 25 °C até 700 °C.

Figura 17 - Perda de massa (a) e Derivada da temperatura de degradação máxima dos filmes ativos (b), onde: FC = filme controle; F01 = filme contendo 0,1% do aditivo, F1 = filme 1% de aditivo e F2 = filme contendo 2% de aditivo, obtidos na análise de TGA.



As curvas termogravimétricas mostraram que não houve variação nas propriedades térmicas do PVC, com pequena diferença na temperatura de perda de massa entre todos os filmes analisados. Verificou-se que ocorreram perdas de massa em três estágios nos diferentes tratamentos e temperaturas, semelhante aos resultados de Jaroszynska et al. (1980) estudando a temperatura de degradação térmica do PVC. Foi verificada a ocorrência de um estágio inicial de decomposição do PVC (perda HCl) entre 200 a 280 °C, com perdas próximas de 3% em massa. O segundo estágio, associado com a maior parte da desidro-halogenação, ocorre a 280 a 360 °C com perda de massa média de 33,6% e o terceiro estágio está associado à decomposição da estrutura da cadeia principal do PVC ocorrendo na faixa de 360 a 500 °C com perdas médias de 77,9%. Silva et al. (2011), cita apenas dois estágios de valores de perda de massa para filmes de PVC em 287,75 °C e 453,8 °C com perdas de massa de 62,85 e 81,16% em relação a massa inicial.

Elashmawi et al. (2010), avaliou a perda de massa de filmes de PVC puro e incorporado de ZnO em diferentes proporções e verificou que o primeiro estágio de degradação do PVC puro ocorreu entre 105 a 240 °C com perda de 13,84%, o segundo estágio entre 240 a 460 °C, com perda de massa de 69,96% e o terceiro estágio de 460 a 500 °C com perda de massa de 84,98%. O valor residual a 600 °C foi de 13,06%, sendo que a temperatura máxima de decomposição ocorreu a 440 °C.

Embora pelos resultados das curvas termogravimétricas, os tratamentos testados apresentaram valores muito próximos, como observado através da Figura 17, são semelhantes aos encontrados por Elashmawi et al. (2010), que no primeiro estágio de degradação do PVC observaram uma perda de massa média de 3,3% (p/p) na faixa de 205 à 251 °C, decorrente muito provavelmente da degeneração química do HCl contido no PVC (SILVA et al., 2011). Na sequência, os autores encontraram um segundo estágio observado em 251 a 417 °C indicando a desidro-halogenação dos filmes, acarretando uma perda mássica média entre os tratamentos de 66,6% e, a finalização do histórico térmico ocorreu entre 417 a 508 °C, com perda de massa média de 90% (p/p).

Silva et al. (2011) desenvolveram filmes de PVC via *casting* e as curvas termogravimétricas de filme de PVC, mostraram dois picos de degradação: 285 e 466 °C para ambas as amostras, com perdas de 61,0 e 87,68%, respectivamente. De acordo com os autores, o primeiro estágio relaciona-se com a descloração de PVC, com a formação e eliminação estequiométrica de HCl, enquanto que o segundo é atribuído a reticulação do polímero contendo ligações C-C.

Pode-se verificar nesse estudo que não houve influência do aumento da concentração do aditivo misto adicionado nos filmes, pois não foram verificadas diferenças entre a degradação térmica do filme controle (FC) e demais filmes aditivados. Deve-se considerar que os percentuais utilizados na composição do filme ativo foram baixos (0,1, 1,0 e 2,0%), o que possivelmente resultou em curvas termogravimétricas muito próximas e por isso, não foi verificado com o aumento da concentração do aditivo, um início antecipado da velocidade de perda de massa.

A termogravimetria é importante para indicar a influência de diferentes concentrações de aditivos sobre a estabilidade térmica do PVC. A Figura 17b indica a influência destas concentrações de aditivos sobre a degradação do PVC. A Tabela 9 apresenta os dados relativos à análise térmica dos filmes desenvolvidos neste trabalho com os valores de perda de massa, mostrando ao final da análise de TGA a 700 °C, que a massa residual para o filme FC foi de 8,5% (p/p) do valor da massa inicial; 10,3% (p/p) para o filme F01; 11,4% (p/p) para o filme F1 e 9,8% (p/p) para o filme F2 (Tabela 9).

Tabela 9 - Temperatura na qual a taxa de degradação é máxima ($T_{m\acute{a}x}$), perda de massa em relação à massa inicial para a $T_{m\acute{a}x}$ das amostras de filmes FC, F01, F1 e F2 e massa residual obtida ao final da análise.

Filme	$T_{m\acute{a}x}$ (°C) estágio 1	Perda de massa (% p/p)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C) estágio 2	Perda de massa (% p/p)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C) estágio 3	Perda de massa (% p/p)	Resíduo (% p/p)
FC	251,5	4,7	312,0	35,3	476,9	79,3	8,5
F01	249,3	3,3	313,8	35,5	472,4	75,7	10,3
F1	235,1	2,1	305,5	24,8	478,1	79,2	11,4
F2	249,6	3,3	317,6	39,0	475,2	77,5	9,8

5.5.2 Medida de espessura e propriedades mecânicas dos filmes

A espessura é uma propriedade importante para a avaliação do desempenho de um material da embalagem, visto esta característica estar relacionada às propriedades mecânicas do filme. Porém, filmes heterogêneos ou irregulares prejudicam a exatidão da medida de espessura. Neste trabalho, as espessuras nominais dos filmes variaram de 8 a 17 mm são ilustradas na Tabela 10 onde são apresentados ainda os valores de força máxima, tensão de escoamento, tensão de ruptura e alongamento na ruptura, relacionados aos ensaios de tração dos materiais. Pode ser verificado que a incorporação do aditivo alterou significativamente a espessura dos filmes. Os resultados mostram um aumento significativo ($p < 0,05$) na espessura dos filmes ativos (F01, F1 e F2), proporcional ao aumento da concentração de AM incorporado em relação ao filme FC. Silva et al. (2011), produziram filmes de PVC pelo método *casting* e encontraram como espessura os filmes variando de 23 à 30 μm .

Varsant et al. (1995) afirmam que algumas partículas podem ser incompatíveis com a matriz polimérica, influenciando a distribuição e homogeneidade como uma função da concentração adicionada. Isto pode explicar a não homogeneidade das partículas encapsuladas em sílica nos filmes que possuem partes insolúveis no polímero, causando muitas vezes sua aglomeração.

Com relação às propriedades mecânicas, estas estão diretamente relacionadas à natureza do material, sendo influenciadas quando a estrutura do filme é alterada pela adição de outra espécie. A resistência à tração é uma propriedade afetada pela espessura do material, onde, em geral, diminui

com a irregularidade na espessura e adicionalmente ao acúmulo das partículas em certas regiões da matriz polimérica, já que as mesmas não apresentaram boa dispersão. Agentes adicionados aos filmes podem afetar significativamente as propriedades físicas, processabilidade e maquinabilidade dos materiais (PÉREZ-PÉREZ et al., 2006).

Dessa forma, não foram verificadas melhorias nas propriedades mecânicas dos filmes. A incorporação do aditivo modificou a propriedade de resistência à tração dos filmes em relação ao filme controle, havendo uma diminuição deste parâmetro, na medida em que a concentração do aditivo foi aumentada, conforme pode ser observado na Tabela 10. O aumento da espessura do filme não aumentou a magnitude das propriedades mecânicas da força máxima (N) e alongamento na ruptura (% erup), em ambas as direções de máquina e transversal (Tabela 10). Porém, os valores encontrados estão dentro do intervalo definido pelo ASTM 882 (2002), para o parâmetro alongamento na ruptura em filmes de PVC, que deve estar compreendido entre 120 e 250%. Outro motivo que pode estar ligado às diminuições mencionadas na tração, é o tipo de partícula do *MKE*, que foram caracterizadas pela análise de SAXS, irregulares em sua forma.

Tabela 10 - Espessura dos filmes e ensaios de tração DM (direção da máquina) e DT (direção transversal) para os filmes ativos (F01, F1 e F2) e para o filme controle.

Direção	Filme	Espessura (mm)	Força máxima (N)	Tensão escoamento (MPa)	Tensão ruptura (MPa)	Alongamento na ruptura (%)
DM	FC	8 ± 0,1 ^{a*}	6,14 ± 0,76 ^a	0,26 ± 0,22 ^a	3,07 ± 0,38 ^a	187,60 ± 26,02 ^a
	F01	11 ± 0,7 ^b	5,12 ± 0,61 ^b	0,32 ± 0,04 ^a	1,86 ± 0,22 ^b	155,60 ± 21,48 ^{ab}
	F1	14 ± 1,3 ^c	4,93 ± 0,87 ^b	0,25 ± 0,03 ^a	1,41 ± 0,25 ^c	134,26 ± 40,43 ^{bc}
	F2	17 ± 1,5 ^d	4,08 ± 0,34 ^c	0,27 ± 0,05 ^a	1,43 ± 0,08 ^c	120,24 ± 17,89 ^c
DT	FC	8 ± 0,1 ^a	5,06 ± 0,66 ^a	0,28 ± 0,15 ^a	2,68 ± 0,33 ^a	219,76 ± 35,02 ^a
	F01	11 ± 0,7 ^b	4,98 ± 0,38 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	1,55 ± 0,14 ^b	160,32 ± 21,59 ^b
	F1	14 ± 1,3 ^c	4,48 ± 0,42 ^b	0,22 ± 0,02 ^a	1,28 ± 0,12 ^c	151,11 ± 17,70 ^b
	F2	17 ± 1,5 ^d	4,49 ± 0,42 ^b	0,24 ± 0,02 ^a	1,15 ± 0,10 ^c	122,98 ± 17,38 ^c

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

A tensão e o alongamento na ruptura diminuíram com o aumento da concentração do aditivo ao filme, tanto para a direção da máquina, quanto para a direção transversal. O alongamento na ruptura variou de 120 a 209% entre os tratamentos. Silva et al. (2011), estudando filmes de PVC pelo método *casting*, encontraram valores de alongamento de ruptura médios para o filme de PVC com adição de plastificante de 127,6%.

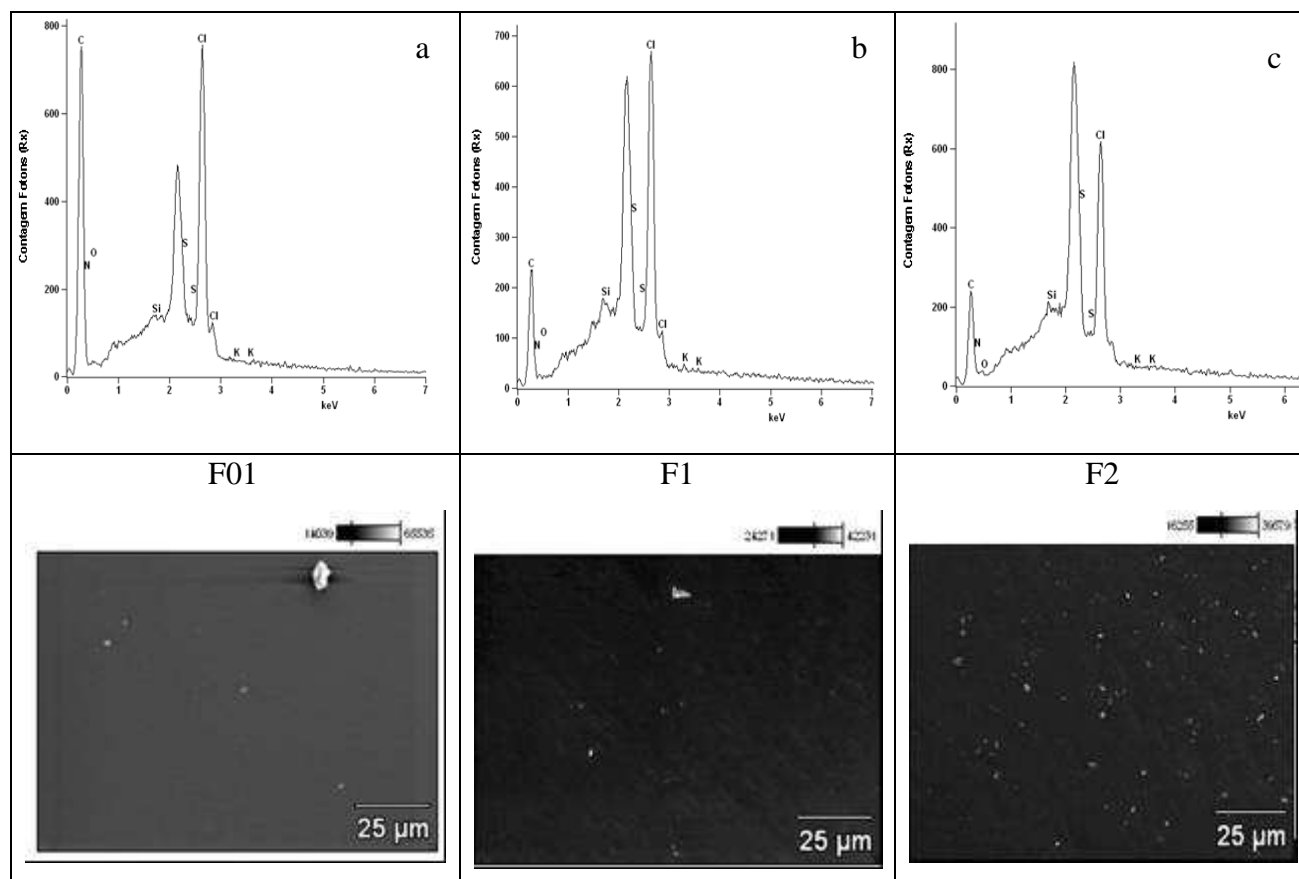
Para o teste em direção de máquina (DM) a análise estatística revelou diferenças entre a força máxima, onde FC difere de F01, F1 e de F2 ($p < 0,05$). Para a tensão de escoamento todos os tratamentos são iguais entre si ($p > 0,05$). A tensão de ruptura apresentou diferença significativa entre os tratamentos. FC e F01 diferem entre si e de todos os demais ($p < 0,05$), F1 e F2 são iguais entre si ($p > 0,05$). Já para o parâmetro alongamento na ruptura, FC é igual a F01. Este é igual a F1, mas diferente de F2. Os tratamentos F1 e F2 são iguais entre si ($p > 0,05$).

Para a avaliação em direção transversal (DT), a análise de variância revelou que o parâmetro força máxima, não apresentou diferença significativa entre FC e F01, diferindo de F1 e F2, ($p < 0,05$), não diferindo de F1 pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância ($p > 0,05$). A tensão de escoamento foi igual estatisticamente entre todos os tratamentos ($p > 0,05$). Para a tensão de ruptura, apenas F1 e F2 são iguais, os demais tratamentos diferem entre si ($p < 0,05$). Com relação ao alongamento na ruptura, a análise revelou diferença entre os tratamentos, sendo FC e F2 diferem entre si e para os demais tratamentos ($p < 0,05$). Os tratamentos F01 e F1 são iguais entre si ao nível de 5 % de significância.

5.5.3 Resultados dos perfis dos elementos químicos presentes e avaliação microscópica dos filmes

A análise de energia dispersiva de raio-X foi usada para determinar a composição elementar dos filmes, principalmente com o intuito de confirmar a presença de átomos no aditivo misto (AM), fração encapsulada (MKE) e não encapsulada (MK). A Figura 18 apresenta os espectros EDX dos elementos, bem como as micrografias com as características morfológicas da superfície dos filmes, onde é possível analisar a distribuição das partículas do aditivo misto. Os espectros EDX confirmam a presença e a distribuição dos elementos: carbono, nitrogênio, oxigênio, silício, enxofre, potássio e cloro, que fazem parte da composição do filme. Destacam-se, picos maiores para enxofre, cloro e silício, que fazem parte da composição do aditivo, filme PVC e agente encapsulante, respectivamente.

Figura 18 - Perfil dos elementos que compõem o filme F01 (a), F1 (b) e F2 (c), obtidos na análise de MEV-EDX por separação de energia de raio X e resultados da análise morfológica da superfície obtida em imagens de MEV.



As imagens obtidas por MEV da superfície das amostras, sugerem alterações na morfologia, com o aumento da concentração dos aditivos incorporados aos filmes. O filme F01 (Figura 18a) apresentou uma topografia mais transparente, sendo o mais homogêneo. Os filmes aditivados F1 e F2 mostraram regiões irregulares, devido à distribuição de partículas, particularmente em F2, onde as distribuições foram mais irregulares. Porém não foi verificada imperfeições nos filmes como furos e bolhas, bem como se pode observar pelas micrografias que as partículas ficaram bem distribuídas por toda a superfície. Observa-se visualmente que o filme F2 apresenta maior concentração de partículas em relação ao filme F01 e ao filme F1. Silveira et al. (2007) estudaram o efeito da adição de ácido sórbico e notaram que concentrações crescentes do ácido adicionado, aumentaram o número de cristais e falhas foram observadas na superfície. O mesmo ocorreu com Pires et al. (2008), quando a adição de nisina/natamicina: notaram a transparência do filme sem a adição, e as falhas estruturais com o aumento da concentração do produto de adição para os filmes. Pode ser verificada a presença de aglomerados de aditivo de diversos tamanhos, apresentando

algumas imperfeições na superfície, provavelmente causados pelo tratamento térmico na termoprensagem.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIESCURECIMENTO

5.6.1 Parâmetros de cor L^* , a^* b^*

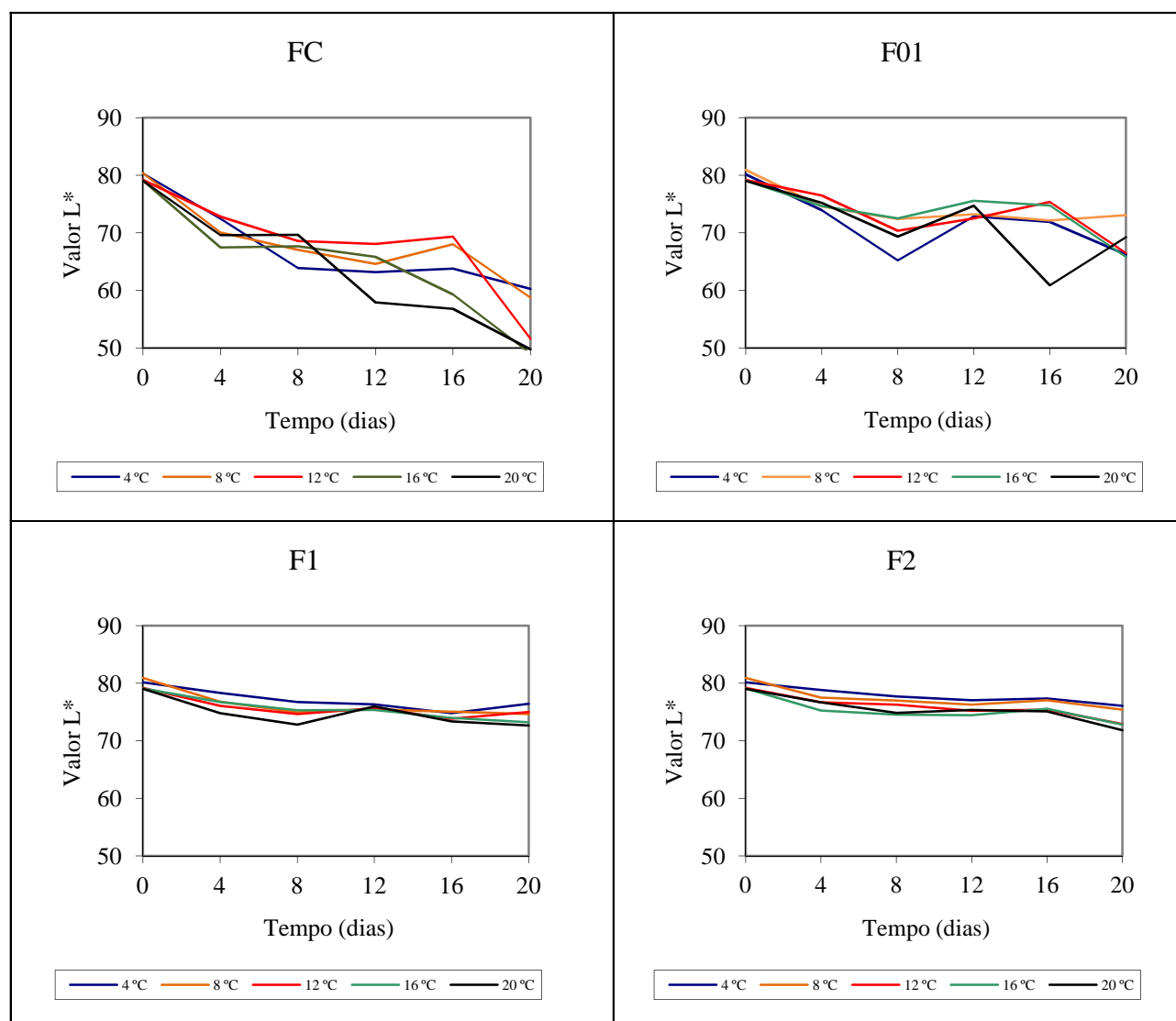
Os valores a^* , b^* e L^* dizem respeito à coloração dos produtos, para se estimar o escurecimento enzimático. O valor de L^* tem sido considerado o melhor parâmetro de cor, pois geralmente pequenas variações são observadas nos valores de a^* e b^* (IYIDOGAN; BAYINDIRLI, 2004).

A redução na luminosidade indica perda de coloração característica do produto, através da verificação da aparência mais escura, indicando que a luminosidade das amostras foi afetada pelas condições deste estudo, assim quanto maior o valor de L^* , melhor, já que menor é o escurecimento. No presente estudo o decréscimo mais acentuado do valor de L^* foi observado para os tratamentos FC e F01, variando em decréscimo de 80 à 55 e de 80 à 61, respectivamente. Não foi observada a mesma diminuição progressiva ao longo do tempo de estocagem para as amostras acondicionadas nos filmes F1 e F2, mantendo valores mais elevados, sendo em decréscimo entre 80 à 74. A Figura 19 apresenta os valores de luminosidade para as maçãs minimamente processadas nas condições deste estudo.

Qi, et al. (2011), estudando o efeito de agentes antiescurecimento e revestimento com quitosana em maçãs minimamente processadas, encontraram valores de L^* variando entre 75 à 60 à 4 °C durante 8 dias de armazenamento.

Eissa et al. (2006) utilizando metabissulfito de sódio na inibição do escurecimento enzimático em fatias de maçãs armazenadas em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C e 35 °C), encontraram valores de L^* variando entre 91,3 a 50,4 nas diferentes temperaturas e concentrações do aditivo ao longo do tempo.

Figura 19 - Valores de L^* para maçãs minimamente processadas acondicionadas nos filmes ativos (F01, F1 e F2) e filme controle (FC), em função do tempo e temperatura de armazenamento.



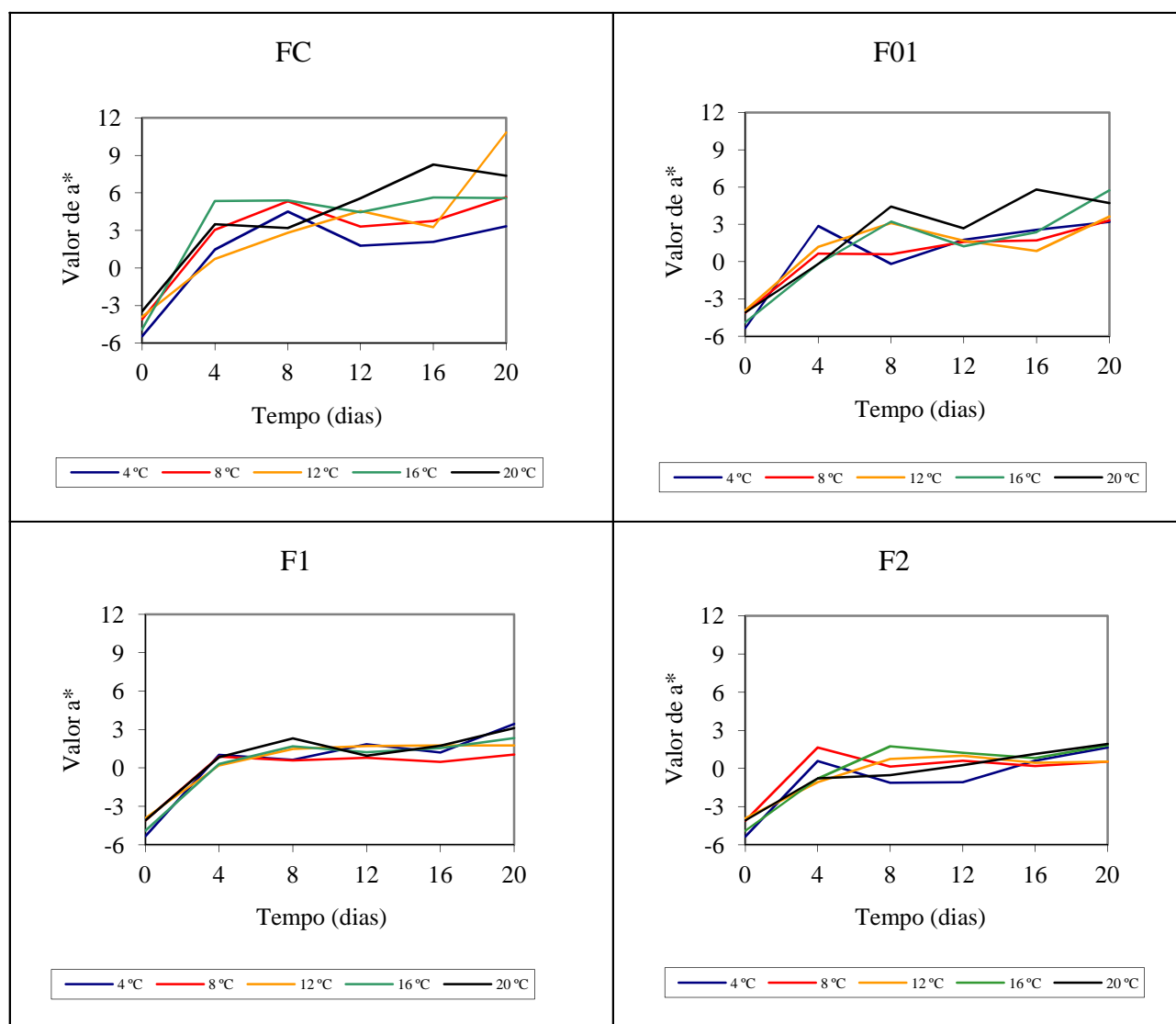
Santos, Soares e Endo (2009), avaliaram os valores de L^* de filme antiescurecimento a base de celulose contendo L-cisteína nas concentrações de 2,5, 5 e 10% ao longo de 8 dias em armazenamento para maçãs minimamente processadas e a variação entre os tratamentos foi de 78 para 71, ao longo dos oito dias de armazenamento. Já Oliveira et al. (2008) estudando embalagens ativas contendo cisteína e sulfito na inibição do escurecimento de maçãs minimamente processadas, verificaram que o decréscimo mais acentuado no valor de L^* foi observado para o tratamento controle (PVC), como observado neste estudo.

A análise de variância revelou diferenças entre os tratamentos, sendo que apenas os tratamentos F1 e F2 foram iguais entre si ($p > 0,05$). Com relação ao tempo de armazenamento, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos iniciais (zero e 4 dias), e o tempo final (20 dias). O mesmo não foi verificado para a variável temperatura ($p > 0,05$), ou seja, a amostra armazenada a 4 °C apresentou valores de L^* semelhantes as amostras armazenadas à 20 °C.

Com relação ao parâmetro a^* , todos os tratamentos diferiram entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Este parâmetro é importante para o estudo do escurecimento, pois a cor marron resultante da presença de melaninas representa uma combinação de verde com vermelho (BARACAT, 2006). Um maior escurecimento é representado por um tom mais avermelhado, ou seja, maiores valores de a^* (Figura 20).

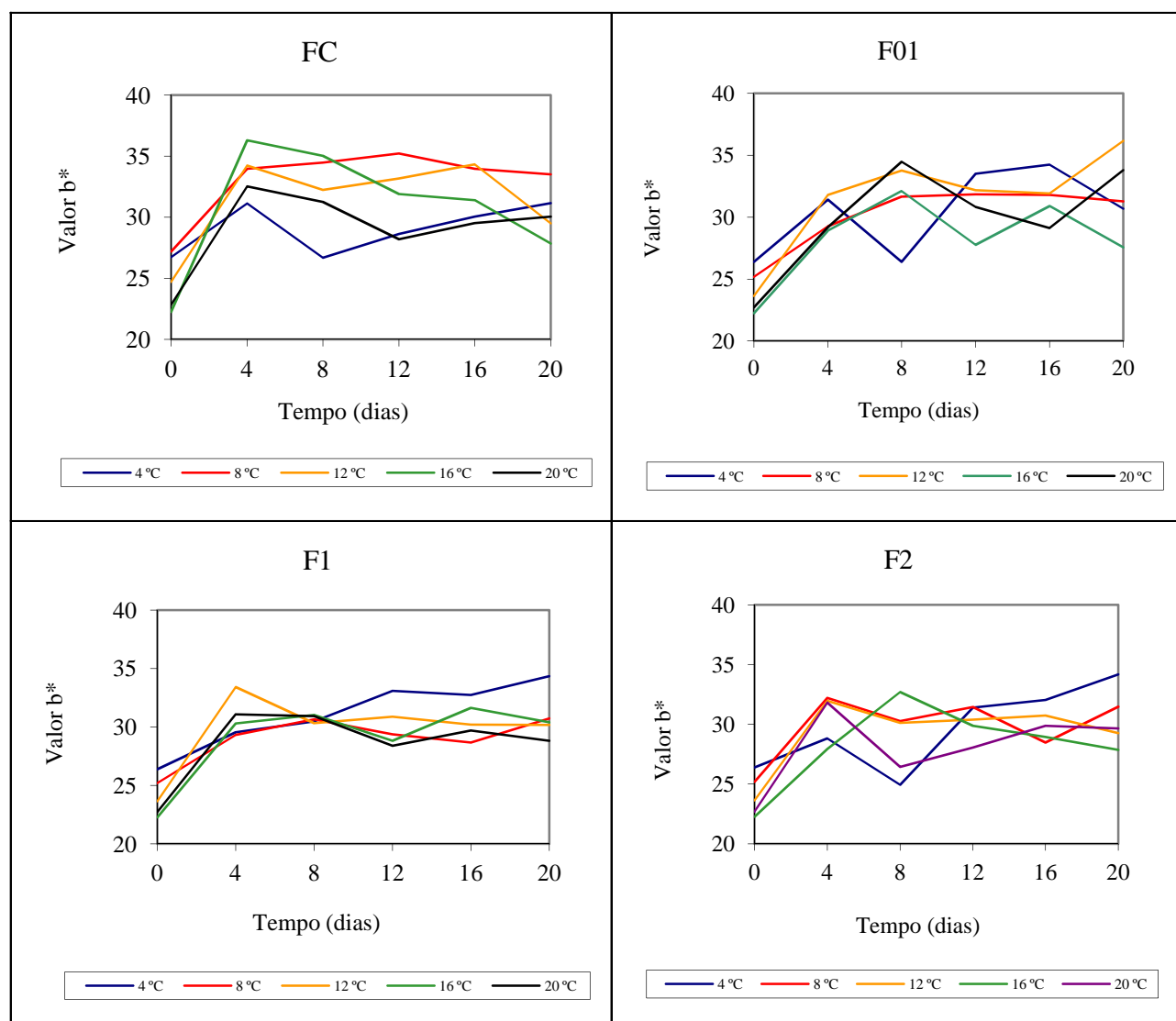
Os tratamentos com adição do *AM* foram satisfatórios nesse aspecto, pois reduziram o valor de a^* quando comparados ao filme controle. Já para as diferenças estatísticas entre as temperaturas estudadas, verificou-se que 4° C diferiu de 16 e 20 °C, da mesma forma que 8 °C diferiu de 20 °C ($p < 0,05$). Entre os tempos, os tempos iniciais (zero e 4 dias) apresentaram diferença significativa dos tempos finais de armazenamento (20 dias).

Figura 20 - Valores de a^* para maçãs minimamente processadas acondicionadas nos filmes ativos (F01, F1 e F2) e filme controle (FC), em função do tempo e temperatura de armazenamento.



Com relação ao parâmetro b , (Figura 21) os tratamentos F1 e F2 diferiram do FC e F01. Os valores situaram-se na faixa positiva e tendendo para o amarelo, cor característica da maçã. Para a variável temperatura, diferem entre si: 8 °C e 12 °C de 16 °C e 20 °C ($p < 0,05$). Com relação ao tempo, o tempo inicial é diferente de todos os demais tempos ($p < 0,05$).

Figura 21 - Valores de b^* para maçãs minimamente processadas acondicionadas nos filmes ativos (F01, F1 e F2) e filme controle (FC), em função do tempo e temperatura de armazenamento.



Lee et al. (2003) avaliaram o efeito antimicrobiano de filmes comestíveis contendo agentes antiescurecimento contendo ácido cítrico, ascórbico e oxálico em diferentes concentrações para estender a vida-de-prateleira de maçãs minimamente processadas e encontraram entre -5,0 e -1,0 para os valores de a^* durante 14 dias de análises quando armazenadas a 3 °C. Já os valores de L^* variaram entre 80 a 71 nas mesmas condições.

Fagundes (2009), avaliando parâmetros físico-químicos do processamento de maçãs Gala minimamente processadas, encontrou valores de cor obtida durante o armazenamento em temperaturas de 2 °C, 5 °C e 7 °C. Valores médios de luminosidade variaram entre 77 e 78, a^* entre -3,9 a -2,8 e b^* entre 22 e 25, próximos aos encontrados neste estudo.

Haminiuk et al. (2005) avaliou o efeito do pré-tratamento com bissulfito de sódio 0,25% no escurecimento de maçãs gala e encontrou valores de b^* entre 31 e 36, valores de L^* entre 93 à 61 e a^* entre -0,45 e 0,99, sendo ainda o tratamento com maior aceitação no teste de análise descritiva quantitativa.

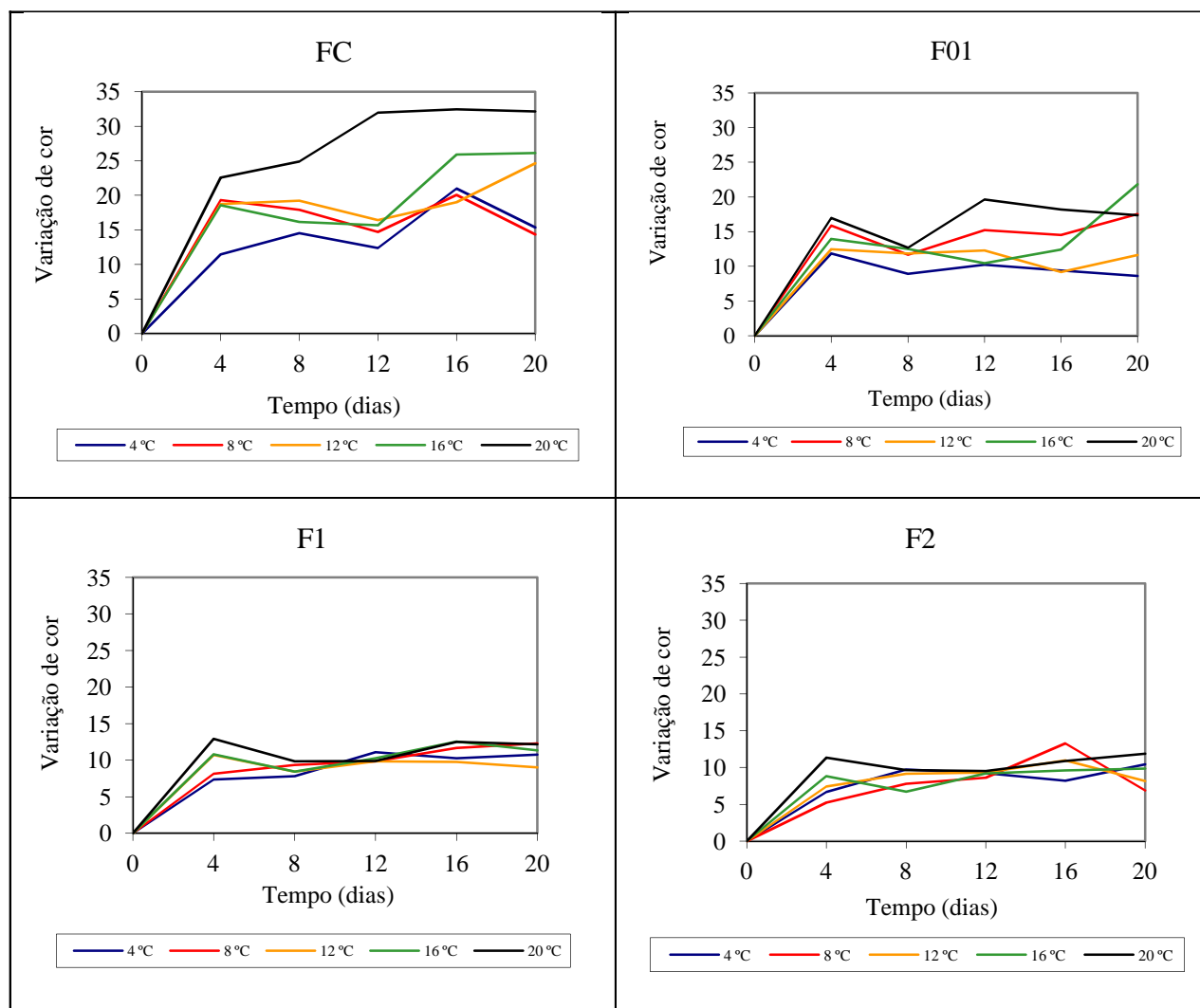
5.6.2 Diferença de cor

A ruptura celular através do corte de frutas é responsável pela liberação do conteúdo intracelular, tais como enzimas, que podem ter um impacto negativo sobre a qualidade de maçãs minimamente processadas, afetando a cor do produto (AHVENAINEN, 1996). A cor é um parâmetro de qualidade crítica de maçãs cortadas que podem limitar a vida útil consideravelmente (ROCHA; MORAIS, 2003).

O monitoramento da diferença de cor durante a vida de prateleira é de grande importância, em virtude de sua relação linear com a formação de pigmentos escuros, sendo importante para avaliar as modificações de cor causadas pela reação de escurecimento. O aumento total da diferença de cor significa que o produto perdeu a coloração característica da amostra inicial (YAMASHITA et al., 2006). A Figura 22 mostra as diferenças de cor ao longo do tempo de armazenamento para as temperaturas deste estudo e a conversão dos parâmetros L^* , a^* e b^* .

Portanto, assim como observado para luminosidade, a coordenada ΔE sofreu influência simultânea do tempo e da temperatura, resultantes da reação de escurecimento enzimático ($p < 0,05$). Com relação aos tratamentos, foi possível verificar que os filmes F1 e F2 reduziram a ΔE , já os filmes FC e F01 foram menos efetivos, apresentando um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de ΔE a qual é um reflexo da perda de coloração original do produto. O tratamento controle (FC) apresentou os maiores valores para a variação de cor. A Figura 22 mostra que a variação de cor foi de zero até 32 para o tratamento FC e de zero até 13 para o tratamento F2, estando os resultados dos filmes F01 e F1 dentro destes intervalos.

Figura 22 - Resultados da diferença de cor (ΔE) de maçãs minimamente processadas entre os tratamentos (F01, F1 e F2) e filme controle (FC), nas temperaturas e tempos de armazenamento.

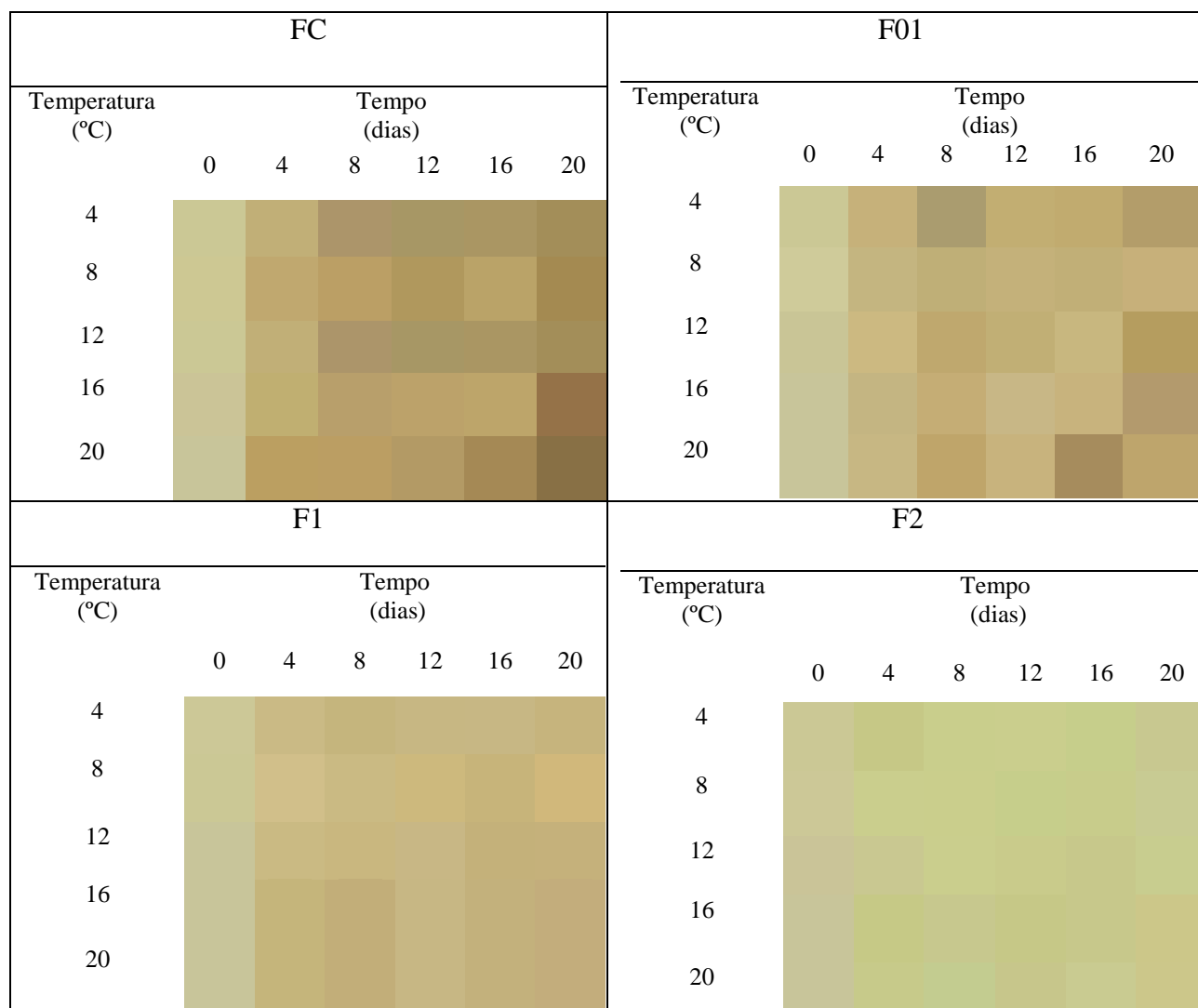


Santos, Soares e Endo (2009) avaliaram a diferença de cor de filme antiescurecimento a base de celulose contendo L-cisteína nas concentrações de 2,5%, 5% e 10% ao longo de 8 dias em armazenamento para maçãs minimamente processadas e os valores para todos os filmes ativos foram menores do que 10, até o oitavo dia de armazenamento.

Eissa et al. (2006) utilizando metabissulfito de sódio na inibição do escurecimento enzimático em fatias de maçãs armazenadas em diferentes temperaturas (4, 25 e 35 °C), encontraram variações de cor muito próximas as deste estudo, onde para o tratamento controle variou de 28,2 a 32,7 e para os tratamentos contendo metabissulfito de sódio de 13,5 a 19,5. A

Figura 23 apresenta os valores de cor RGB, convertidos a partir dos parâmetros médios de L^* , a^* , b^* , em maçãs minimamente processadas entre os tratamentos nas temperaturas e tempos de armazenamento.

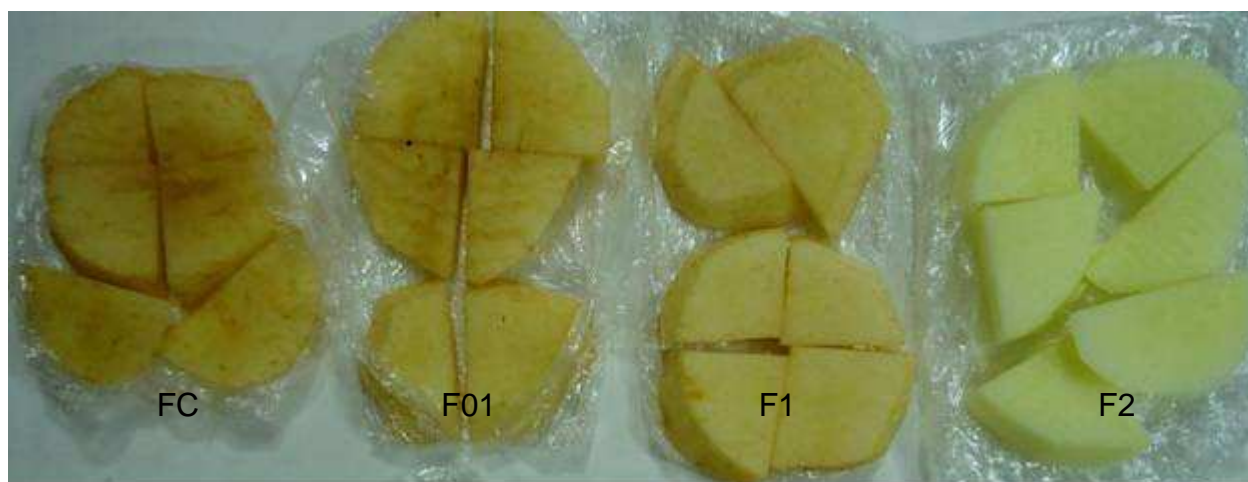
Figura 23 - Valores de cor RGB em maçãs minimamente processadas entre os tratamentos (FC, F01, F1 e F2), nas temperaturas e tempos de armazenamento.



A Figura 23 indica que as variações de cor e a intensidade de cor RGB foram maiores na medida em que ocorreu o aumento da temperatura e do tempo de estocagem. A intensidade de cor foi maior para o filme FC e mais clara para o filme F2, indicando um efeito inibidor do escurecimento pela ação do aditivo. Os resultados são confirmados pela Figura 24, que apresenta os resultados do efeito antiescurecimento nas maçãs minimamente processadas envolvidas nos

filmes acondicionadas a 4 °C com 16 dias de estocagem. Como podem ser observados visualmente através da Figura 24, os filmes ativos contendo maior concentração de aditivo (F1 e F2) apresentaram ação antiescurecimento superior aos filmes FC e F01, enquanto o filme F2 preservou a coloração inicial da maçã.

Figura 24. Resultados do efeito antiescurecimento de filmes controle (FC) e filmes ativos F01 (0.1%), F1 (1.0%) e F2 (2.0%) armazenados a 4 ° C com 16 dias de estocagem.



Son et al. (2001), avaliaram o efeito inibitório de vários agentes antiescurecimento em fatias de maçã e destacaram diversos agentes antiescurecimento, que mostraram-se satisfatórios com relação a cor das amostras, entre os quais ácido oxálico, ácido oxalacético, ácido ascórbico, cisteína, ácido kojico e hexil-resorcinol.

5.6.3 Índice de escurecimento (*IE*)

Em relação à cor das amostras de maçã, avaliadas pelo *IE*, a análise de variância revelou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo F1 e F2 estatisticamente iguais, diferindo dos demais (FC e F01) pelo teste de Tukey a 5% de significância. Referente à temperatura, esta não interferiu no índice de escurecimento, já que não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as condições de estocagem testadas. No entanto, verificou-se a influência do tempo sobre o *IE* em que o tempo zero (inicial) e 20 dias (final) diferiam uns dos

outros. A Figura 25 mostra a superfície de resposta para *IE* em relação aos tratamentos, efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento.

Podem ser observados na Figura 25 que os valores de *IE* foram maiores para os filmes FC e F01, associados com o tempo de estocagem. O *IE* enzimático depende de vários fatores, principalmente do conteúdo de compostos fenólicos e do tipo de polifenoloxidase presente na célula.

Eissa et al. (2006) avaliaram o agente sulfito em fatias de maçãs armazenadas em diferentes temperaturas. Eles observaram que as concentrações cada vez maiores do aditivo promoveram diminuição do escurecimento das amostras. Da mesma forma, os autores descobriram que o mesmo efeito foi proporcional ao aumento dos valores de L^* em todas as temperaturas. Oliveira et al. (2008) estudaram a utilização de sulfitos em embalagens ativas, verificando uma tendência para reduzir o *IE* em filmes contendo 1% de sulfito em amostras de maçã e observaram que mesmo abaixo de 4 °C, a enzima ainda exibia atividade, indicando que a reação de escurecimento não poderia ser eliminada completamente somente por estocagem a baixa temperatura. Estudos realizados por Janovitz-Klapp et al. (1990) mostraram que, na mesma concentração (1%), o bissulfito demonstrou maior eficiência na inibição do escurecimento em maçãs, seguido de cisteína e ácido ascórbico. Os autores atribuem isso ao fato de que o bissulfito afeta diretamente a *PPO*, enquanto que a cisteína reage com *o*-quinonas formando produtos que inibem de forma mais branda a reação enzimática.

Um aumento do efeito inibitório de escurecimento pode ser visto como um aumento da concentração do agente no filme (F1 e F2). No entanto, deve-se considerar que a taxa de liberação da embalagem é dependente de vários fatores, incluindo o tempo de armazenamento, temperatura, e o encapsulamento do aditivo, o que pode resultar em variações nas percentagens de inibição durante o armazenamento.

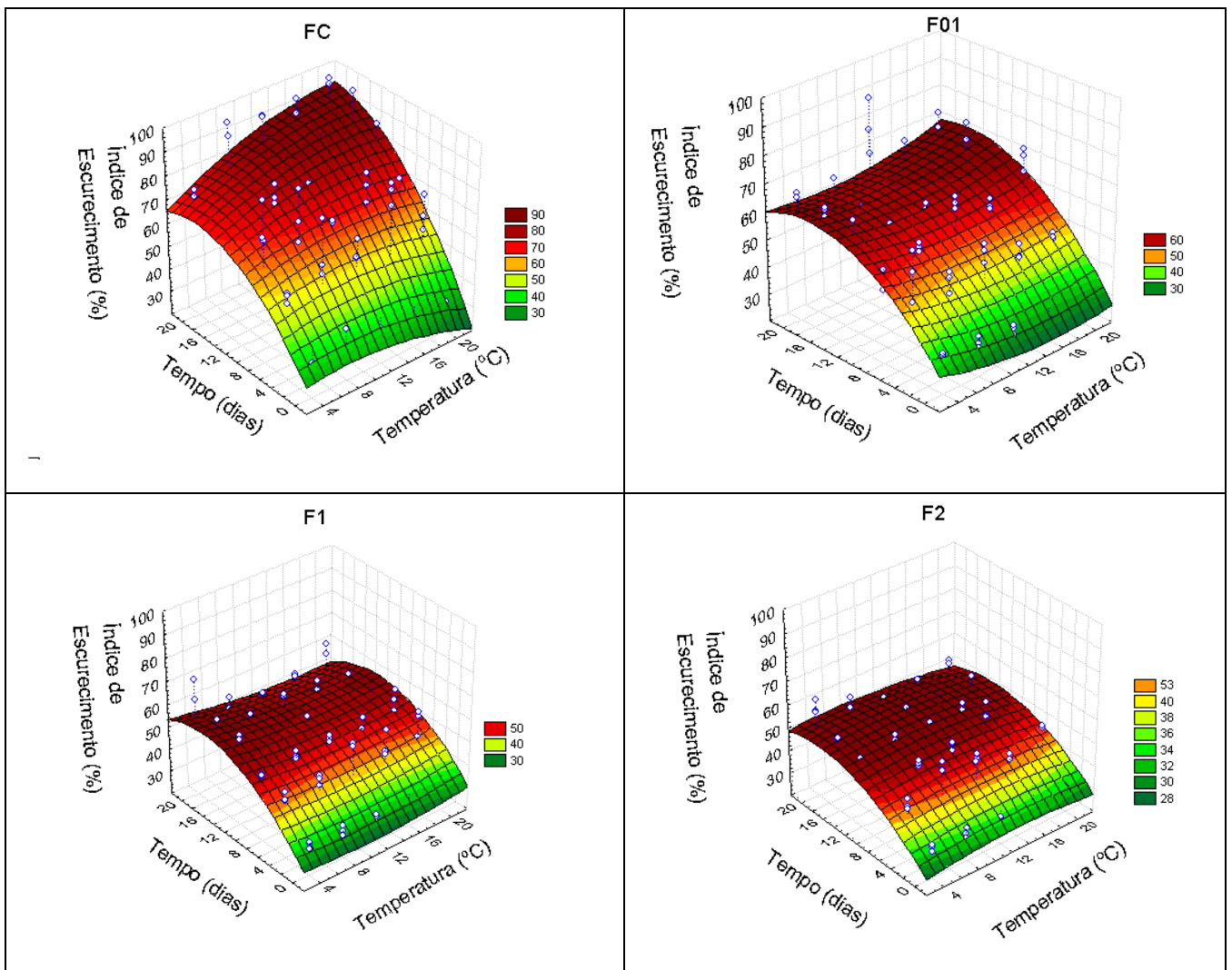
Com relação à variável tempo, os tempos zero e 20 diferiram entre si e de todos os tempos ($p < 0,05$), sendo possível observar que o índice de escurecimento foi aumentando com o período de estocagem, condição observada também com a temperatura, já que variações foram verificadas.

Para o filme FC, o *IE* atingiu valores de cerca de 90% durante o tempo de armazenamento, enquanto F01, mostrou níveis próximos de 70% para as temperaturas e tempos maiores e (20 °C e

20 dias), indicando a ação de efeito antiescurecimento, embora em menor intensidade. Os melhores valores de *IE* foram encontrados para as amostras embaladas em F1 e F2, que foram de 60% e 50%, respectivamente.

Olivas et al. (2007), utilizando revestimento comestível contendo alginato em maçãs Gala minimamente processadas e submetidas a tratamento térmico, obtiveram após 8 dias de armazenamento a 5 °C com o uso de cloreto de cálcio, resultados com 20% menos do que o escurecimento maçãs de controle. Um índice de escurecimento de 45% foi obtido para as maçãs não revestidos mas tratadas térmicamente, apresentando maior índice de escurecimento do que aqueles sem tratamento térmico.

Figura 25 - Superfícies de respostas para o parâmetro IE em função do tempo e temperatura de armazenamento para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.



Fagundes (2009), avaliando parâmetros físico-químicos do processamento de maçãs Gala minimamente processadas, analisou valores de cor obtida durante o armazenamento em temperaturas de 2 °C, 5 °C e 7 °C durante 11 dias, encontrando valores médios de *IE* entre 29 a 37%. Já Perez-Gago, Serra e Ríó (2006), encontraram bons resultados com aplicação de 1% de ácido ascórbico em maçãs minimamente processadas *Golden delicious* armazenadas a 5 °C por 13 dias, onde os valores de *IE* variaram entre 30 e 32%, todos inferiores aos obtidos neste estudo, (entre 28 a 90%) nos diferentes tratamentos, considerando as diferentes condições de estocagem, embalagens e do sistema de acondicionamento.

5.6.4 Percentual de inibição do escurecimento

A Tabela 11 apresenta os resultados do efeito antioxidante dos filmes ativos na inibição do escurecimento enzimático quando comparados com o filme controle.

Tabela 11 - Resultados do percentual de inibição do escurecimento enzimático dos filmes ativos F01, F1 e F2 contra maçãs minimamente processadas nas condições de estocagem.

Temperatura (°C)	F01	F1	F2
4	28,25 ± 17,7 ^{a*A**}	79,23 ± 17,15 ^{aB}	79,53 ± 6,77 ^{aB}
8	63,3 ± 4,92 ^{bB}	71,23 ± 0,95 ^{aB}	74,64 ± 4,62 ^{aB}
12	58,06 ± 16,4 ^{bB}	86,17 ± 8,37 ^{aC}	76,59 ± 1,7 ^{aC}
16	62,46 ± 8,23 ^{bD}	77,46 ± 9,02 ^{aD}	75,96 ± 11, ⁸¹ ^{aD}
20	66,6 ± 5,89 ^{bD}	78,19 ± 12,57 ^{aD}	75,38 ± 8,1 ^{aD}

*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey para o parâmetro temperatura.

**Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey para o parâmetro tempo.

O percentual de inibição variou mais efetivamente em amostras armazenadas em temperaturas mais elevadas, atingindo valores próximos à 80%, sendo resultados importantes para produtos não tratados termicamente. Com relação aos tratamentos, podem ser verificados percentuais de inibição inferiores para o filme F01 e mais elevados para F1 e F2, os quais foram muito próximos entre si.

Este resultado foi semelhante ao encontrado por Eissa et al. (2006) utilizando metabissulfito de sódio (0,05 mg) na inibição do escurecimento enzimático em fatias de maçãs armazenadas em diferentes temperaturas (4, 25 e 35 °C), onde os percentuais de inibição foram de 80, 76,8 e 74,8%, respectivamente para essas temperaturas.

Iyidogan e Bayindirli (2004), estudaram o efeito da L-cisteína, ácido kojico e 4-hexilresorcinol para inibir o efeito enzimático em sucos de maçã e encontraram um percentual de inibição de até 89,2% com 24 horas de armazenamento, onde o uso da combinação de agentes anti-escurecimento reduz as concentrações requeridas que é importante para as propriedades organolépticas do suco.

Santos, Soares e Endo (2009), avaliaram o percentual de inibição de filme antiescurecimento a base de celulose contendo L-cisteína nas concentrações de 2,5, 5 e 10% ao longo de 8 dias em armazenamento para maçãs minimamente processadas e para o filme contendo 10%, atingiu percentuais de inibição acima de 60% até o sexto dia de armazenamento. Os autores Crumiére (2000) e Eissa et al. (2006), avaliaram o efeito de cisteína e sulfito em maçãs, e mostraram um efeito inibidor sobre a *PPO*, à medida que a concentração dos agentes foi aumentada.

O filme de PVC apesar de não possuir barreira a gases, como o oxigênio, ainda assim, contribui para a redução da atividade enzimática, provavelmente por dificultar o contato do sítio ativo da enzima com o oxigênio, o que mostra que esse polimérico pode exercer um efeito complementar na inibição do escurecimento enzimático (OLIVEIRA et al., 2008).

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO

Os *VMP* são produtos altamente perecíveis e sua vida útil limitada em poucos dias, variando de 5 a 7 dias (SANTOS et al., 2010). Allende e Artés (2003) citam que sua vida útil limitada, que é geralmente não mais de 8 dias, quando armazenado em condições adequadas. No Brasil, a temperatura máxima de armazenamento recomendada nos rótulos de *VMP* é de 7 °C, que é o suficiente para manter a qualidade e segurança dos produtos processados sob rigorosas condições de higiene durante pelo menos 6 dias, ou seja, período de vida útil comum desses produtos no país (MAISTRO et al., 2012).

Este período é condicionado a população microbiológica e devido à baixa temperatura de armazenamento, acaba sendo dominada por micro-organismos psicrotróficos (ORDÓÑEZ, 2005; ZAGORY, 1999). Convencionou-se que acima de 6 ciclos logarítmicos o produto já não apresenta qualidade para consumo. Lee, Park e Choi (2003), relatam que substâncias tóxicas podem ser produzidas quando contagens microbiológicas excedem $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$. As legislações da França e da Alemanha, admitem limites de $7,7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e a legislação japonesa até $5 \log \text{UFC.g}^{-1}$ para contagem total de micro-organismos psicrotróficos (SANTOS et al., 2010).

A análise de variância para o parâmetro número de sobreviventes indicou que os tratamentos FC e F01 são iguais entre si ($p > 0,05$), apresentando populações maiores. No entanto, eles são diferentes de F1 e F2, que também são diferentes entre si ($p < 0,05$), os quais apresentaram um menor número de sobreviventes, indicando a importância da concentração de aditivo.

Considerando-se o efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento microbiano, verificou-se uma forte influência sobre a taxa de crescimento ($p < 0,05$). Amostras dos tratamentos F1 e F2, armazenadas à temperatura 4°C apresentaram valores inferiores à 6 ciclos logarítmicos durante todo o período de armazenamento (20 dias). Já na temperatura de 8°C , o limite máximo aceitável encontrado até 12 dias de armazenamento, prevaleceu apenas para o F2. Todos os demais tratamentos apresentaram valores superiores neste dia. Para a temperatura de 12°C , o F2 manteve este ciclo com apenas 8 dias, neste mesmo período o FC, F01 e F1 apresentaram valores superiores. Na temperatura de 16°C , já no quarto dia de estocagem, os valores estavam acima de 6 ciclos de log, o mesmo observado com 20°C . Lee, Park e Choi (2003) encontraram resultados mais baixos para maçãs variedade Fuji armazenadas a 4°C durante 2 semanas, que não excederam $4 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

Com exceção de 16°C e 20°C ; estas duas temperaturas não apresentavam diferenças entre si na taxa de crescimento. É possível afirmar que o aumento da temperatura, favoreceu o desenvolvimento dos psicrotróficos. Estes dados evidenciam que temperaturas superiores à 5°C favorecem o crescimento desses micro-organismos, que segundo Ahvenainen (1996), são os deteriorantes de ocorrência natural nos alimentos refrigerados, apresentando vantagem competitiva sobre muitos patógenos.

Já para a análise dos tempos de armazenamento, os tempos finais 12 até 20 dias de estocagem, também não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). O tempo de

armazenamento também influenciou o desenvolvimento de micro-organismos até ao décimo segundo dia, o que pode ser um fator associado com a fase estacionária do ciclo de crescimento, após esse período.

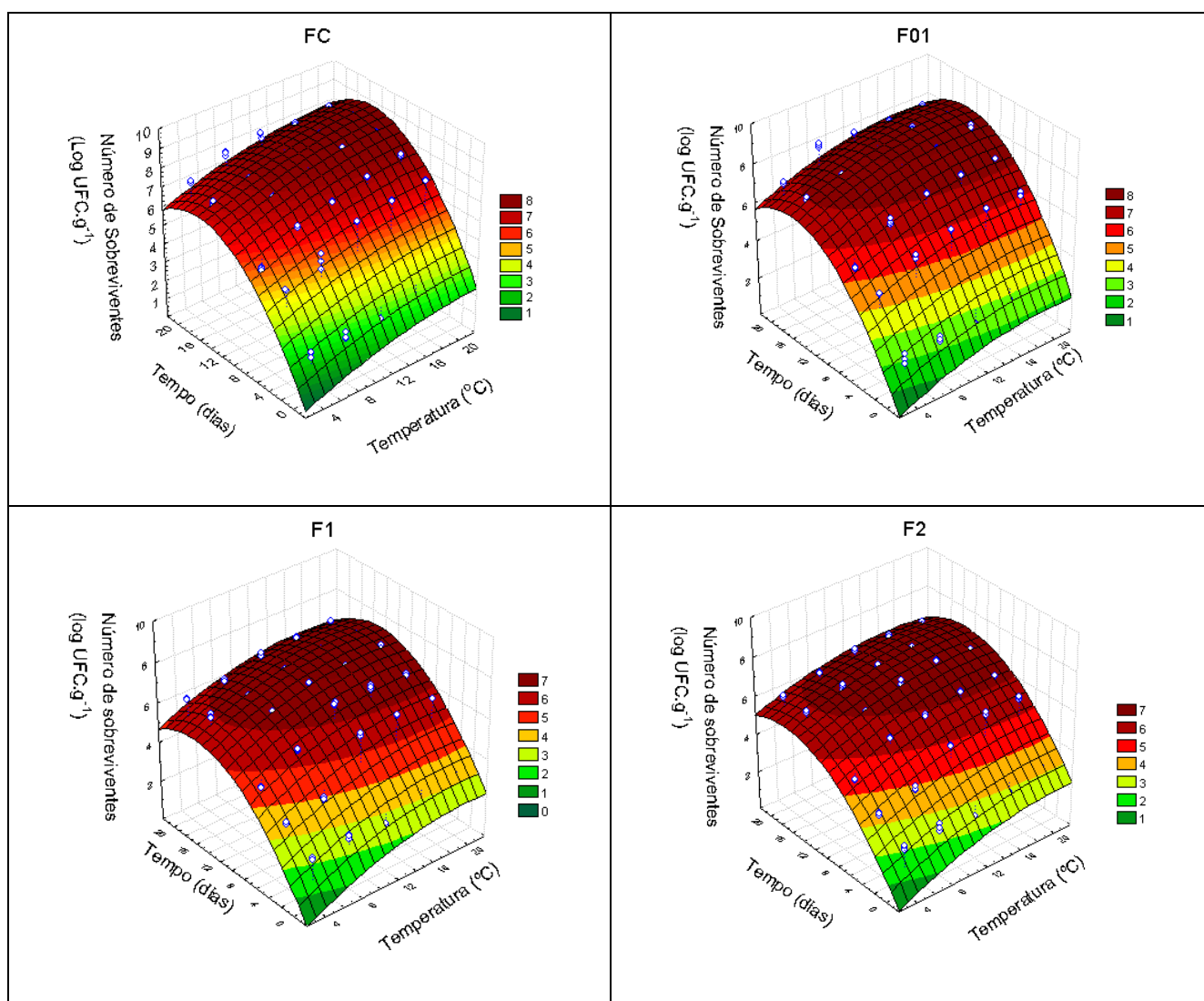
A Tabela 12 e a Figura 26 reforçam os resultados da análise de variância, uma vez que os resultados mostram que aumentando a temperatura e tempo de armazenamento, o aumento da população microbiana. O crescimento dos psicrotróficos foi elevado variando de 2,1 (tempo zero) a 8,2 log (tempo 20 dias) entre os tratamentos, em diferentes temperaturas, sendo superiores para os filmes FC e F01.

Lee et al. (2003) avaliaram o efeito antimicrobiano de filmes comestíveis contendo agentes antiescurecimento contendo ácido cítrico, ascórbico e oxálico em diferentes concentrações para estender a vida-de-prateleira de maçãs minimamente processadas e encontraram após 14 dias de estocagem a 3 °C contagem de psicrotróficos acima de 6 log de UFC.g⁻¹ limitando em até duas semanas a vida-de-prateleira do produto.

Endo et al. (2008) estudaram filmes ativos na conservação de batatas minimamente processadas, onde encontraram para psicrotróficos aos 9 dias de armazenamento de 4,6 (controle) a 5,4 ciclos logarítmicos. Já Silva, Soares e Geraldine (2003) encontraram cerca de 8 ciclos logarítmicos (UFC.g⁻¹) para psicrotróficos em mandioca minimamente processada acondicionada em diferentes embalagens aos 12 dias de estocagem a 10 °C.

De acordo com Brackett e Splittstoesser (2001), nos vegetais frescos, a população microbiana pode apresentar uma grande variação, onde a contagem total de micro-organismos psicrotróficos podem atingir valores tão altos quanto 9 log UFC.g⁻¹. Fatores de qualidade de vegetais minimamente processados são afetados, resultado na rejeição do produto, quando as contagens microbiológicas são na maioria dos casos elevadas (entre 7 e 8 log UFC.g⁻¹) (RAGAERT et al., 2007). Neste estudo, os valores máximos estiveram próximos de 8 log UFC.g⁻¹. Esses micro-organismos fazem parte da microbiota normal e têm pouca relação com a qualidade ou a segurança da matéria prima, por isso, a legislação brasileira não estabelece limites. Entretanto, esta microbiota participa ativamente da deterioração de frutas e hortaliças, sendo estas reações mais acentuadas em vegetais minimamente processados, devido à presença de tecidos lesados e maior teor de umidade (SANTOS et al., 2010).

Figura 26 - Superfícies de respostas para o parâmetro número de sobreviventes ($\log \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) em função do tempo e temperatura de armazenamento para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.



Foi possível avaliar a redução decimal do crescimento dos psicrotróficos entre os tratamentos, especialmente comparando-se o filme F2 em relação ao FC, onde ao longo do período de armazenamento apresentou uma redução decimal entre 1,0 e 1,6 log (Tabela 12).

Tabela 12 - Enumeração da população microbiana ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) em maçãs minimamente processadas para os filmes FC, F01, F1 e F2, nas diferentes condições de armazenamento.

Temperatura	Filmes	Dia 0		Dia 4		Dia 8		Dia 12		Dia 16		Dia 20	
		Pop MO \pm dp	Red*	Pop MO \pm dp	Red.	Pop MO \pm dp	Red.	Pop MO \pm dp	Red.	Pop MO \pm dp	Red.	Pop MO \pm dp	Red.
4°C	FC	2.44 \pm 0,16 ^{aA}	-	4.89 \pm 0,05 ^{aB}	-	5.19 \pm 0,10 ^{aC}	-	6.04 \pm 0,06 ^{aD}	-	6.95 \pm 0,14 ^{aE}	-	7.23 \pm 0,07 ^{aE}	-
	F01	2.15 \pm 0,27 ^{aA}	-0.29	4.66 \pm 0,04 ^{aB}	-0.23	5.09 \pm 0,05 ^{aC}	-0.10	6.00 \pm 0,05 ^{aD}	0.04	6.94 \pm 0,09 ^{aE}	-0.01	7.04 \pm 0,07 ^{aE}	-0.19
	F1	2.47 \pm 0,04 ^{aA}	0.03	3.37 \pm 0,08 ^{aB}	-1.52	4.28 \pm 0,01 ^{bC}	-0.91	5.16 \pm 0,03 ^{aD}	-0.88	6.15 \pm 0,13 ^{aE}	-0.80	6.17 \pm 0,04 ^{aE}	-1.06
	F2	2.42 \pm 0,13 ^{aA}	-0.02	3.27 \pm 0,06 ^{aB}	-1.62	4.14 \pm 0,03 ^{cC}	-1.05	4.98 \pm 0,04 ^{aD}	-1.06	5.90 \pm 0,08 ^{aE}	-0.94	6.00 \pm 0,04 ^{aE}	-1.23
8°C	FC	2.50 \pm 0,17 ^{bA}	-	5.56 \pm 0,38 ^{bB}	-	6.55 \pm 0,05 ^{bC}	-	7.23 \pm 0,04 ^{bD}	-	7.43 \pm 0,07 ^{bE}	-	7.96 \pm 0,11 ^{bE}	-
	F01	2.29 \pm 0,14 ^{bA}	-0.21	5.67 \pm 0,13 ^{bB}	0.11	6.62 \pm 0,16 ^{bC}	0.07	7.14 \pm 0,04 ^{bD}	-0.09	7.25 \pm 0,18 ^{bE}	-0.18	8.16 \pm 0,11 ^{bE}	0.20
	F1	2.67 \pm 0,13 ^{bA}	0.17	3.68 \pm 0,09 ^{bB}	-1.88	5.28 \pm 0,08 ^{bC}	-1.27	6.41 \pm 0,01 ^{bD}	-0.82	6.21 \pm 0,17 ^{bE}	-1.23	6.34 \pm 0,09 ^{bE}	-1.62
	F2	2.55 \pm 0,19 ^{bA}	0.05	3.69 \pm 0,13 ^{bB}	-1.87	5.48 \pm 0,03 ^{bC}	-1.07	6.00 \pm 0,04 ^{bD}	-1.18	6.51 \pm 0,13 ^{bE}	-0.92	6.45 \pm 0,03 ^{bE}	-1.51
12°C	FC	2.49 \pm 0,09 ^{cA}	-	6.79 \pm 0,01 ^{cB}	-	7.02 \pm 0,05 ^{cC}	-	7.33 \pm 0,03 ^{cD}	-	7.45 \pm 0,04 ^{cE}	-	8.20 \pm 0,14 ^{cE}	-
	F01	2.16 \pm 0,08 ^{cA}	-0.33	6.22 \pm 0,01 ^{cB}	-0.57	7.25 \pm 0,04 ^{cC}	0.23	7.43 \pm 0,03 ^{cD}	0.10	7.25 \pm 0,08 ^{cE}	-0.20	8.08 \pm 0,04 ^{cE}	-0.12
	F1	2.32 \pm 0,14 ^{cA}	-0.17	6.04 \pm 0,09 ^{cB}	-0.75	6.74 \pm 0,08 ^{cC}	-0.28	7.02 \pm 0,03 ^{cD}	-0.31	6.79 \pm 0,16 ^{cE}	-0.66	6.91 \pm 0,11 ^{cE}	-1.29
	F2	2.16 \pm 0,11 ^{cA}	-0.33	5.06 \pm 0,02 ^{cB}	-1.73	5.84 \pm 0,06 ^{cC}	-1.18	6.68 \pm 0,13 ^{cD}	-0.65	6.64 \pm 0,31 ^{cE}	-0.81	6.86 \pm 0,08 ^{cE}	-1.34
16°C	FC	2.53 \pm 0,12 ^{cdA}	-	7.09 \pm 0,01 ^{cdB}	-	7.52 \pm 0,03 ^{cdC}	-	8.13 \pm 0,13 ^{cdD}	-	8.21 \pm 0,03 ^{cdE}	-	8.07 \pm 0,05 ^{cdE}	-
	F01	2.47 \pm 0,14 ^{cdA}	-0.06	6.48 \pm 0,01 ^{cdB}	-0.61	7.43 \pm 0,05 ^{cdC}	-0.09	8.04 \pm 0,05 ^{cdD}	-0.09	8.29 \pm 0,07 ^{cdE}	-0.08	7.93 \pm 0,09 ^{cdE}	-0.14
	F1	2.40 \pm 0,17 ^{cdA}	-0.13	6.18 \pm 0,04 ^{cdB}	-0.91	6.79 \pm 0,10 ^{cdC}	-0.73	7.10 \pm 0,02 ^{cdD}	-1.03	6.89 \pm 0,10 ^{cdE}	-1.32	6.89 \pm 0,16 ^{cdE}	-1.18
	F2	2.50 \pm 0,14 ^{cdA}	-0.03	5.95 \pm 0,10 ^{cdB}	-1.14	6.25 \pm 0,03 ^{cdC}	-1.27	7.06 \pm 0,04 ^{cdD}	-1.07	6.83 \pm 0,19 ^{cdE}	-1.38	6.79 \pm 0,14 ^{cdE}	-1.28
20°C	FC	2.64 \pm 0,05 ^{dA}	-	7.34 \pm 0,04 ^{dB}	-	7.87 \pm 0,06 ^{dC}	-	8.34 \pm 0,01 ^{dD}	-	8.47 \pm 0,03 ^{dE}	-	8.11 \pm 0,16 ^{dE}	-
	F01	2.50 \pm 0,19 ^{dA}	-0.14	6.46 \pm 0,13 ^{dB}	-0.88	7.49 \pm 0,01 ^{dC}	-0.38	8.33 \pm 0,20 ^{dD}	-0.01	8.13 \pm 0,02 ^{dE}	-0.34	8.04 \pm 0,06 ^{dE}	-0.07
	F1	2.52 \pm 0,19 ^{dA}	-0.02	6.22 \pm 0,10 ^{dB}	-1.12	6.67 \pm 0,07 ^{dC}	-1.20	7.23 \pm 0,12 ^{dD}	-1.11	7.04 \pm 0,14 ^{dE}	-1.43	7.07 \pm 0,05 ^{dE}	-1.04
	F2	2.63 \pm 0,12 ^{dA}	-0.01	5.92 \pm 0,09 ^{dB}	-1.42	6.28 \pm 0,02 ^{dC}	-1.59	6.89 \pm 0,05 ^{dD}	-1.45	6.79 \pm 0,18 ^{dE}	-1.68	6.71 \pm 0,13 ^{dE}	-1.4

* Pop MO \pm dp: população microbiana em $\log (\text{UFC.g}^{-1})$ e desvio padrão.

Red.: redução decimal da população microbiana

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey para o parâmetro temperatura.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey para o parâmetro tempo.

Dipersio et al. (2004) avaliaram o efeito antimicrobiano da adição de metabissulfito de sódio na conservação de pêssego desidratado, para a redução do crescimento de *Listeria monocitogenes*, onde foi possível reduzi-lo em 1,5 a 2,0 log a população, com relação ao tratamento controle. Já Muriel-Galet et al. (2012), estudando o efeito antimicrobiano de filmes incorporados com diferentes óleos essenciais para conservação de vegetais minimamente processados, encontraram para psicotróficos um crescimento de 4,41 a 5,98 log no primeiro e oitavo dias de armazenamento entre os tratamentos, com uma redução decimal de 1,2 log com adição de citral 5%. Os demais tratamentos e concentrações de óleos não apresentaram redução decimal superior a 1,0 log. De acordo com Abadias et al. (2008), os psicotróficos podem crescer durante a comercialização em frutas frescas minimamente processadas e quando produtos embalados não são armazenados à temperatura baixas, que são as mais recomendadas (normalmente entre 1 e 5 ° C).

Maçãs minimamente processadas têm uma vida comercial mais curta do que na forma *in natura*, causando um aumento da susceptibilidade a deterioração microbiana, que é estimulado pelo fermento do tecido (OLIVAS et al., 2007). Deve-se considerar que é esperado um maior efeito antimicrobiano nos testes *in vitro* do que nas condições práticas, ou seja, no contato da embalagem com o alimento, uma vez que nestas condições existe a interação entre o filme, o agente ativo e a matriz alimentícia.

Como a temperatura é um fator extrínseco que afeta o crescimento de micro-organismos (JACXSENS et al. 2002; CHURCH; PARSONS, 1995), é facilmente observado que os melhores valores de redução da carga microbiana ocorreram nas temperaturas mais baixas, de modo ascendente (4 ° C a 20 ° C). A temperatura de armazenamento de 8 ° C por até seis dias é recomendada para manter a qualidade e segurança desses produtos (MAISTRO et al., 2012). No estudo corrente, considerando-se a cinética da redução da carga microbiana sob as temperaturas de 8 ° C e 12 ° C, o filme F01, não reduziu a população microbiana de pelo menos um ciclo de registro em relação ao controle, durante 20 dias de estocagem. No entanto, os filmes de F1 e F2 promoveram esta redução média de um ciclo logarítmico ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 12).

O fator limitante da vida de prateleira de produtos hortícolas minimamente processados MPV é a carga de micro-organismos psicotróficos, que deve ser mantida baixa, uma vez que as

substâncias tóxicas podem ser produzidas quando este valor ultrapassa esta contagem microbiológica (LEE et al. 2003). No quarto dia de estocagem, os resultados do presente estudo demonstram que as condições de armazenamento favoreceram o crescimento de microorganismos em maçãs embaladas em FC que já não são aptas para o consumo ($6 \log \text{UFC.g}^{-1}$). Filmes F1 e F2 mantiveram a qualidade microbiológica aceitável para até oito dias, o que representa um aumento de duas vezes na vida de prateleira de maçãs armazenadas a 8 °C em comparação com o controle. Para as condições de armazenamento de 12 °C, a qualidade microbiológica foi mantida apenas para o filme F2 durante 8 dias de estocagem.

Uma redução na população microbiana, em todas as condições de armazenamento para os diferentes tratamentos pode ser observada. A composição do aditivo misto (AM) (50% MK, 50% MKE), adicionado a filmes, é o responsável por este comportamento. Assume-se que a fração de MK sofre dissociação imediatamente, gerando efeito antimicrobiano nos primeiros dias de armazenagem, enquanto que a fração encapsulada, devido à matriz de sílica, necessita de mais tempo para gerar efeitos (CAPELETTI et al. 2010b), mantendo-se o efeito de redução durante mais tempo, de forma semelhante ao efeito antiescurecimento.

5.8 ENERGIA DE ATIVAÇÃO (E_a) SOBRE O EFEITO ANTIESCURECIMENTO E ANTIMICROBIANO

A energia de ativação (E_a), obtida pela equação de Arrhenius, é um parâmetro importante para correlacionar a influência da temperatura sobre as velocidades de degradação enzimática e microbiológica. A E_a mede a variação da energia potencial de um par de moléculas necessária para iniciar o processo de conversão de um par de moléculas reagentes em um par de moléculas de produtos (LEHNINGER et al., 1995).

A Figura 27 apresenta os parâmetros cinéticos do IE em função do tempo de armazenamento nas cinco temperaturas deste estudo (4, 8, 12, 16 e 20 °C) e o logaritmo da constante de velocidade em função do inverso de temperatura absoluta para todos os tratamentos, com as constantes das taxas de reação ajustadas em função da temperatura com os respectivos coeficientes de determinação (R). O resultado mostra que a E_a foi maior para o F2, o que confirma uma velocidade de degradação enzimática menor para este tratamento, indicando o efeito inibitório do filme ativo. Os resultados da análise de variância e teste de

Tukey ao nível de significância de 5% indicam que os valores de *Ea* para o parâmetro *IE* dos filmes FC e F01 são iguais ($p > 0,05$), mas diferente de F1 e F2, os quais também diferem entre si ($p < 0,05$).

Os valores de *Ea* determinados para os diferentes tratamentos levando em consideração as cinco temperaturas de estocagem (4 °C, 8 °C, 12 °C, 16 °C e 20 °C) sobre o parâmetro crescimento microbiológico são apresentados na Figura 28, que representa o logaritmo da constante de velocidade de crescimento microbiológico em função do inverso de temperatura absoluta para todos os tratamentos. Também são apresentadas as constantes das taxas de reação ajustadas em função da temperatura de armazenamento com os respectivos coeficientes de determinação (*R*). Para o efeito antimicrobiano, a análise de variância mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) e revelou que F2 difere de FC, mas é igual a F01 e F1 ($p > 0,05$), uma vez que os tratamentos de FC, F01 e F1 são estatisticamente iguais entre si.

O crescimento microbiológico foi maior no FC, onde a *Ea* foi menor, e o crescimento foi menor para as amostras acondicionadas no filme F2, onde a *Ea* foi maior. Quanto maior a *Ea*, mais difícil de a reação ocorrer, ou seja, no filme F2, ocorreu inibição do crescimento, a reação de crescimento microbiológico foi mais lenta, o que indica que o filme ativo F2 apresentou maior efeito antimicrobiano, com velocidades de crescimento e/ou degradação microbiológica menores. A Tabela 13 apresenta os resultados dos parâmetros cinéticos de *Ea* e Coeficiente de determinação (*R*) para efeito antiescurecimento e antimicrobiano em maçãs minimamente processadas.

Pode ser verificado que a *Ea* aumentou proporcionalmente à concentração do aditivo incorporado nos filmes, indicando que a quanto maior a *Ea*, mais lenta a taxa de reação, isto é, as alterações são menores e mais difíceis de ocorrer (LEHNINGER et al., 1995), mostrando a influência da temperatura sobre as velocidades das reações enzimáticas e microbiológicas. Ao contrário, quanto mais baixa for a *Ea* de uma reação, mais elevada será a velocidade da mesma, tanto para o crescimento microbiano, quanto para as reações de escurecimento. Os vegetais minimamente processados exibem maior sensibilidade à temperatura, alterando a sua *Ea* em comparação com produtos in natura. Assim, a escolha de materiais de embalagem deve considerar esta sensibilidade aumentada (JACXSENS et al. 2000).

Figura 27 - Parâmetros cinéticos e gráfico de Arrhenius do índice de escurecimento em função do tempo e temperatura de estocagem para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.

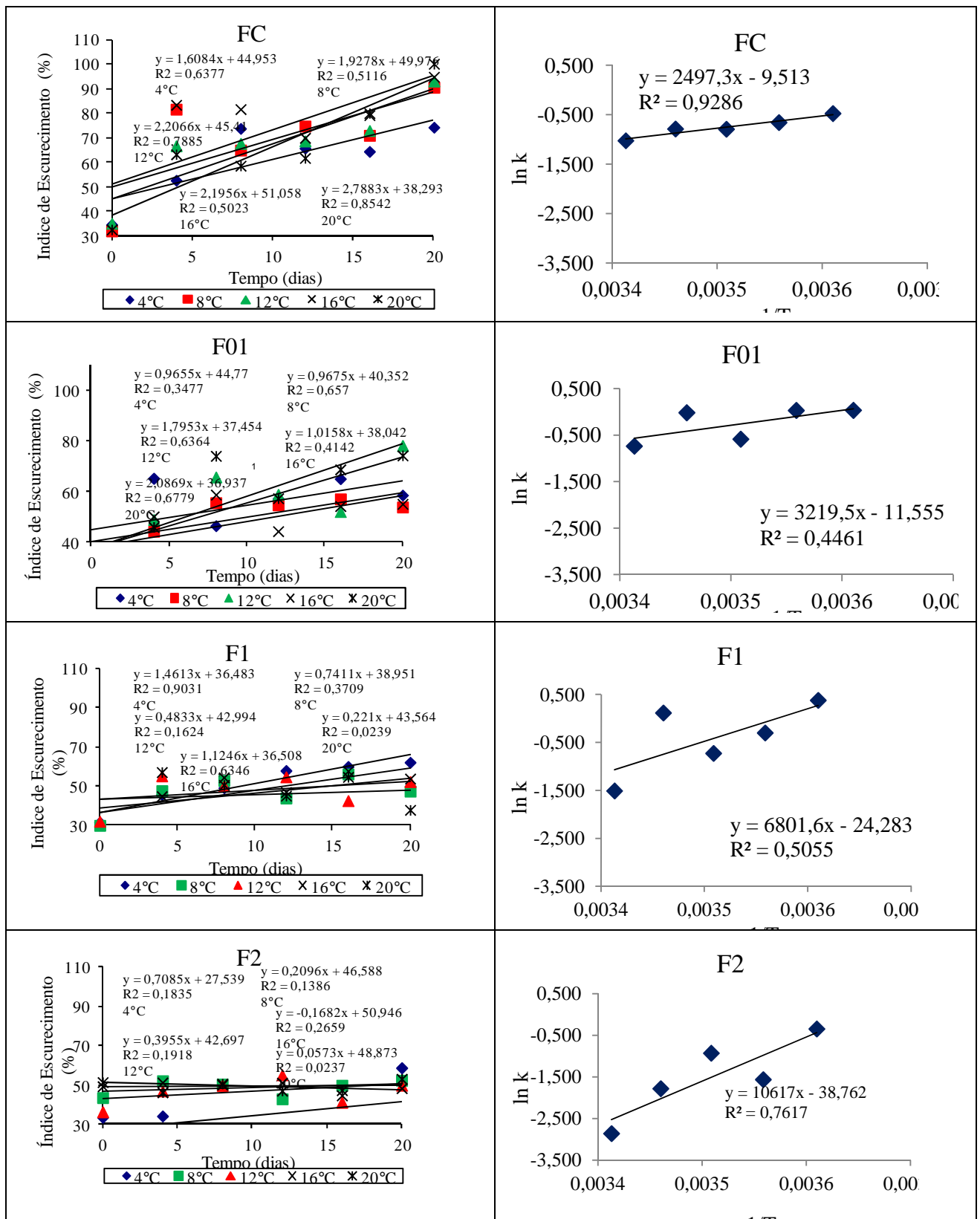


Figura 28 - Parâmetros cinéticos e gráfico de Arrhenius do número de sobreviventes em função do tempo e temperatura de estocagem para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.

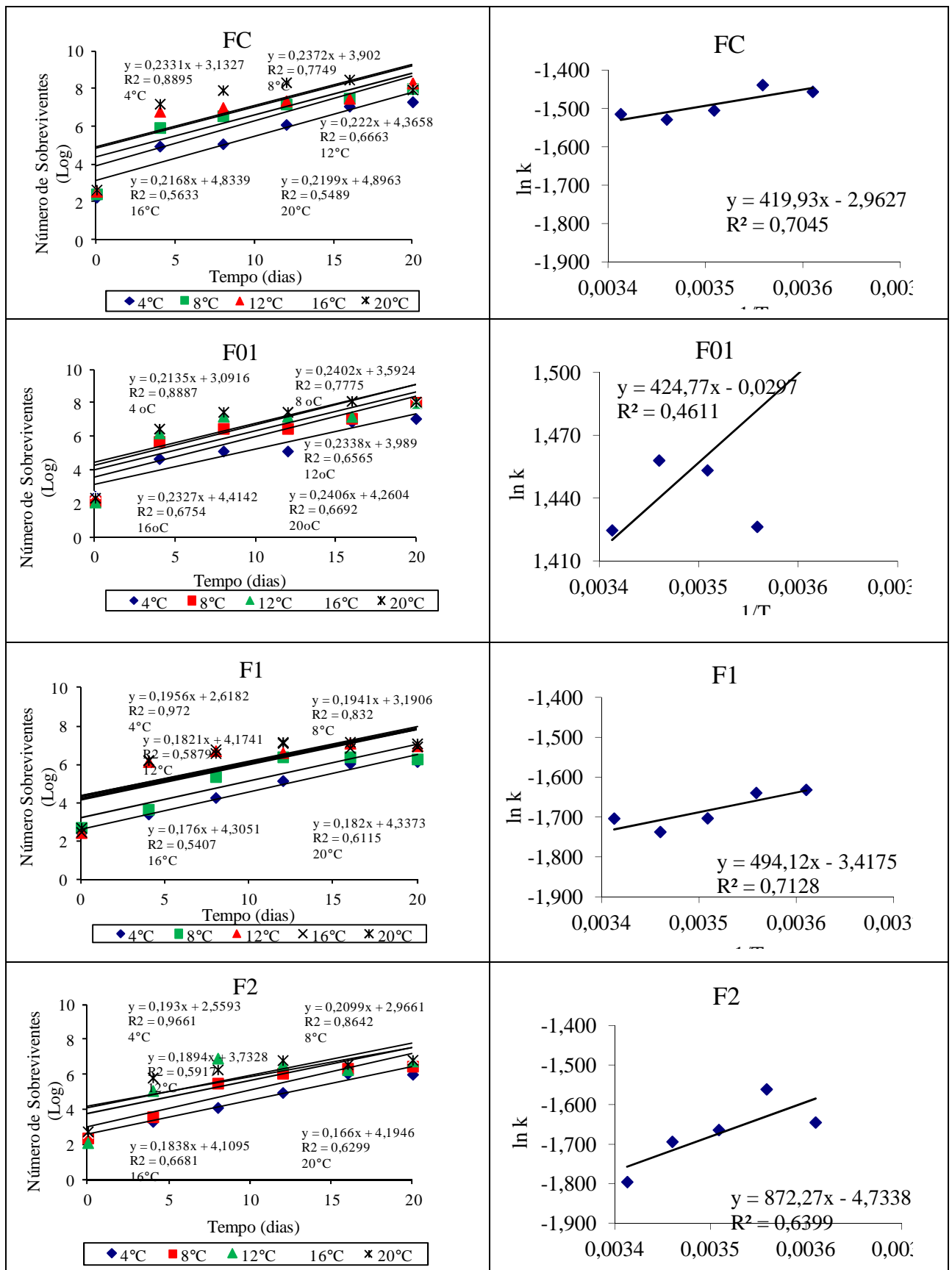


Tabela 13 - Parâmetros cinéticos de Energia de ativação (E_a) e Coeficiente de determinação (R) para efeito antiescurecimento e antimicrobiano em maçãs minimamente processadas.

Filmes	Efeito antiescurecimento		Efeito antimicrobiano	
	E_a (kcal.mol ⁻¹)	R	E_a (kcal.mol ⁻¹)	R
FC	4,96±1,88 a*	0,964	0,81±0,36 a	0,839
F01	6,40±2,55 a	0,668	0,84±0,25 ab	0,679
F1	13,51±2,47 b	0,711	0,98±0,72 ab	0,844
F2	21,09±4,69 c	0,873	1,73±0,27 b	0,800

* Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A magnitude da energia de ativação é uma indicação da influência da temperatura de cada uma das barreiras de processo. Quanto maior a E_a , maior é a dependência da temperatura para a reação ocorrer (ULLOA et al., 2009). Os mesmos autores estudaram o efeito de diferentes aditivos, incluindo o bissulfito de sódio na estimativa de difusividade dos mesmos em fatias de manga e encontraram uma E_a de 4,88 kcal.mol⁻¹ para o bissulfito de sódio, indicando a dependência da temperatura na difusividade do aditivo.

A E_a de frutas e hortaliças *in natura* varia de uma faixa de 6,9 a 22,2 kcal.mol⁻¹. (EXAMA et al., 1993). Alguns valores de E_a encontrados no presente estudo foram menores, como já era esperado, uma vez que são produtos minimamente processados, que apresentam E_a menores do que produtos *in natura*. Produtos *in natura* apresentam E_a maiores que correspondem à velocidades menores de reações do que os minimamente processados, considerando que quanto maior o valor de E_a , menores são as taxas de reações.

Verificou-se que os valores de energia de ativação encontrados nos tratamentos F1 e F2 sobre o efeito antiescurecimento, são compatíveis com as alterações de cor em produtos alimentícios. Moura et al. (2007), estudaram a cinética de degradação enzimática de maçã passa armazenada em filme de polietileno nas temperaturas de 5, 25 e 35 °C e a degradação de cor apresentou uma energia de ativação de 7,6 kcal.mol⁻¹.

Luo e Barbosa-Cánovas (1997), estudaram o efeito antiescurecimento de 4-hexilresorcinol em combinação com ácido ascórbico em maçãs gala e outras cultivares de maçãs

e utilizaram os parâmetros L^* e a^* para o estudo da E_a , onde encontraram respectivamente para L^* : 12,2, a^* : 12,3, indicando a dependência da temperatura nas reações de escurecimento enzimático, semelhante ao observado neste estudo para os filmes F1 e F2.

Em trabalho realizado com purê de manga tratado a diferentes temperaturas, Ahmed et al. (2002) encontraram energias de ativação em torno de $36,79 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a degradação da cor total (L^*, a^*, b^*). Os mesmos autores encontraram para purê de mamão tratado termicamente uma energia de ativação de $32,59 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a degradação da cor, todos os valores maiores do que os encontrados neste estudo, indicando a dependência da cor com o efeito da temperatura.

5.9 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DE QUALIDADE

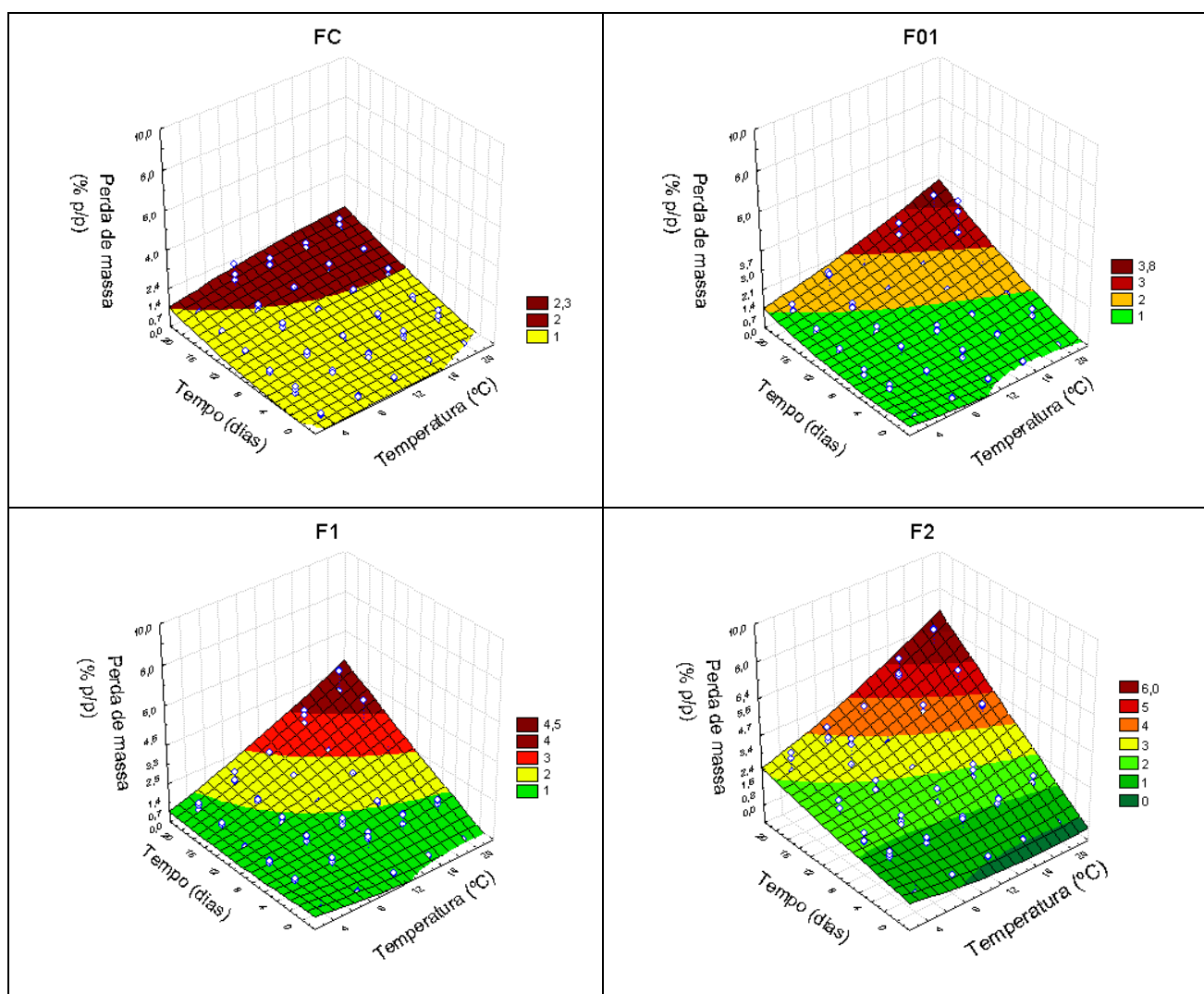
5.9.1 Perda de massa

Fatias de maçãs expõem o tecido sem casca para um ambiente com umidade relativa do ar, e fazem com que ocorra perda de peso substancial (QI et al., 2011). Nesse estudo, de maneira geral, é possível afirmar que a perda de massa foi afetada pelos tratamentos, pelo período de armazenamento e temperatura, conforme podem ser observadas as superfícies de respostas da Figura 29.

Através da análise de variância foi verificado que o tratamento F2 difere de todos os demais, onde os maiores valores de perdas de massa foram encontrados (até 6,7%). Os tratamentos: FC e F01 são iguais entre si, onde as perdas de massa foram menores, sendo para o filme F01 de 3,7% e para o filme controle, 2,4%. Os filmes F01 e F1 (que apresentou até 4,8% de perda de massa) também não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$).

Os resultados verificados neste estudo, onde as perdas de peso foram maiores para as maçãs acondicionadas nos filmes contendo maior concentração do aditivo estão relacionados com o aumento da permeabilidade desses filmes, permitindo maior perda de massa do produto com relação ao controle.

Figura 29 - Superfícies de respostas para o parâmetro perda de massa (PM) em função do tempo e temperatura de armazenamento para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.



Olivas et al. (2007) revestindo maçãs gala com alginato encontraram perdas de massa maiores. Após 2 dias de armazenagem, as maçãs controle (sem adição de revestimento) perderam cerca de 20% de seu peso e maçãs revestidas com alginato, 7% e com 10 dias esses valores chegaram a 31,4 e 17,8%, respectivamente. Qi et al. (2011), utilizando quitosana no revestimento de maçãs minimamente processadas avaliaram as perdas de massa, onde após 2 dias de armazenagem, as amostras controle apresentaram 19% de seu peso, enquanto as maçãs revestidas perderam 14,3% de seu peso, valores bem superiores aos encontrados neste estudo.

Foi verificado que o aumento da temperatura utilizada nos testes influenciou a perda de massa. Foram verificadas diferenças significativas entre as temperaturas mais baixas (4 °C) e as

mais elevadas (16 °C e 20 °C) ($p < 0,05$). Já os tempos iniciais de estocagem não diferiram entre si, mas foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) na perda de massa após 12, 16 e 20 dias de estocagem.

Fagundes (2009), avaliando parâmetros físico-químicos do processamento de maçãs Gala minimamente processadas, encontrou a máxima perda de massa obtida durante o armazenamento em 0,3% a 7 °C. Perez-Gago, Serra e Río (2006) encontraram 3% de perda de massa fresca para maçãs minimamente processadas armazenadas a 5 °C por 13 dias embaladas em filmes de polipropileno e tratadas com solução de concentração de 0,5% e 1,0 % de ácido ascórbico. Segundo Kang e Lee (1998), a perda de 5% de massa em produtos frescos causa amolecimento e perda de frescor do produto. Neste estudo somente o tratamento F2, ao final do armazenamento e em condições de alta temperatura ultrapassam esse valor.

Maçãs sofrem perda de peso mais rapidamente quando cortadas, através do aumento da área superficial e liberação do conteúdo intracelular, já que não possui a casca que funciona como uma barreira muito eficiente para evitar a perda de água (RESTUCIA et al., 2010).

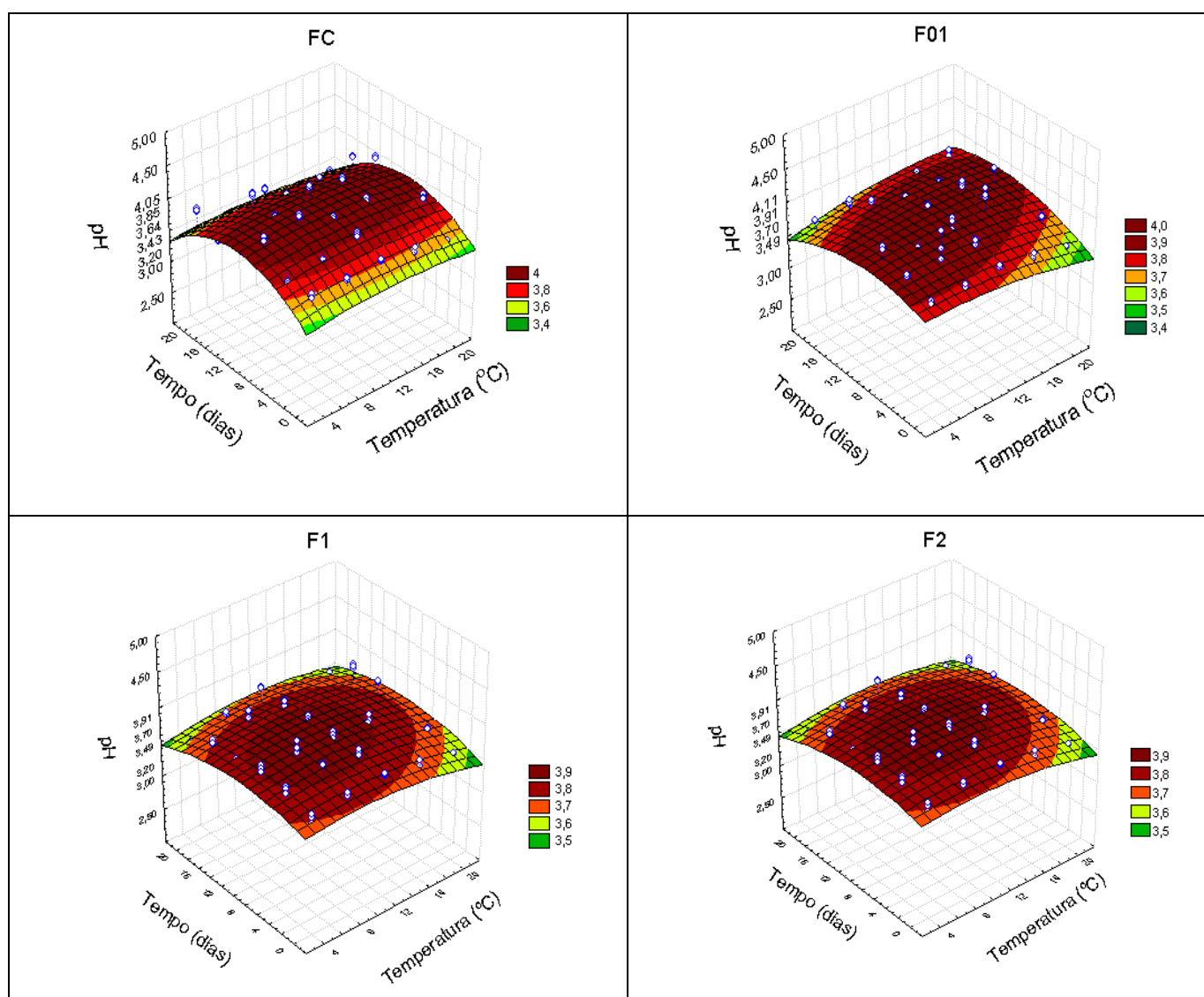
Lima et al. (2005) estudando a adição de diferentes agentes antiescurecimento, antimicrobiano e filmes de PVC e polietileno no processamento mínimo de mamão, avaliaram a perda de massa, onde o polietileno apresentou a menor perda, porém, permitiu um aumento da umidade no interior da embalagem que propiciou o surgimento de fungos. Diferente disso, a embalagem de PVC, apresentou maior perda de massa, no valor de 6% em 5 dias de armazenamento, porém pela maior permeabilidade que apresenta não gerou aumento da umidade relativa e por isso foi escolhido como o melhor filme, pois apresentava 100% da embalagem sem a incidência de fungos após 5 dias de armazenamento.

5.9.2 pH

A título de monitoramento, foram realizadas as análises de pH para correlacionar com a presença de micro-organismos fermentativos e deteriorantes, uma vez que a presença destes podem alterar o pH do meio. Além disso, para verificar a influência existente com os tempos e as temperaturas de estocagem. A Figura 30, apresenta as superfícies de respostas para o parâmetro pH em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Os valores de pH encontrados para todos os tratamentos foram baixos, (até 4,0), durante o período de estudo, indicando uma boa estabilidade microbiológica. Entretanto, através da análise de variância, foi observado que houve mudanças nos valores de pH durante a armazenagem. O tratamento F2 apresentou diferença significativa de FC e F01. No caso da variável temperatura, verificou-se haver influência sobre o pH, sendo que 4 °C diferiu de 8 e 12 °C. Já as temperaturas 16 e 20 °C não diferiram entre si para o parâmetro pH.

Figura 30 - Superfícies de respostas para o parâmetro pH em função do tempo e temperatura de armazenagem para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.



Para os tempos foram encontradas mudanças nos valores de pH, uma vez que foram verificadas diferenças significativas entre os valores de pH nos tempos iniciais (zero) e tempos finais (vinte dias), sendo que os tempos 4 e 8; bem como 12 e 16 que são iguais entre si ($p > 0,05$), indicando que o conteúdo total de ácidos orgânicos no produto não variaram entre estes períodos.

Os valores obtidos também estão de acordo com a legislação, através da instrução normativa do MAPA N. 1 de 2000, que estabelece a faixa de 3,3 a 4,5 para o pH de polpas e frutas (BRASIL, 2000).

5.9.3 Contaminação microbiológica

Os resultados das análises de *Salmonella* spp e Coliformes termotolerantes indicaram que não houve contaminações por micro-organismos patogênicos ou indicadores de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Todas as amostras apresentaram boa estabilidade microbiológica, nas temperaturas analisadas não sendo observadas as presenças de *Salmonella* em 25 g e a contagem de Coliformes termotolerantes encontrada foi inferior a 5×10^2 UFC.g⁻¹. No Brasil ainda não existe uma legislação específica para alimentos minimamente processados (SANTOS et al., 2010), sendo assim, seguem-se os padrões microbiológicos estabelecidos na resolução RDC 12/2001 da Anvisa para “frutas frescas preparadas e refrigeradas para consumo direto” (BRASIL, 2001), estando as amostras em conformidade com este regulamento técnico.

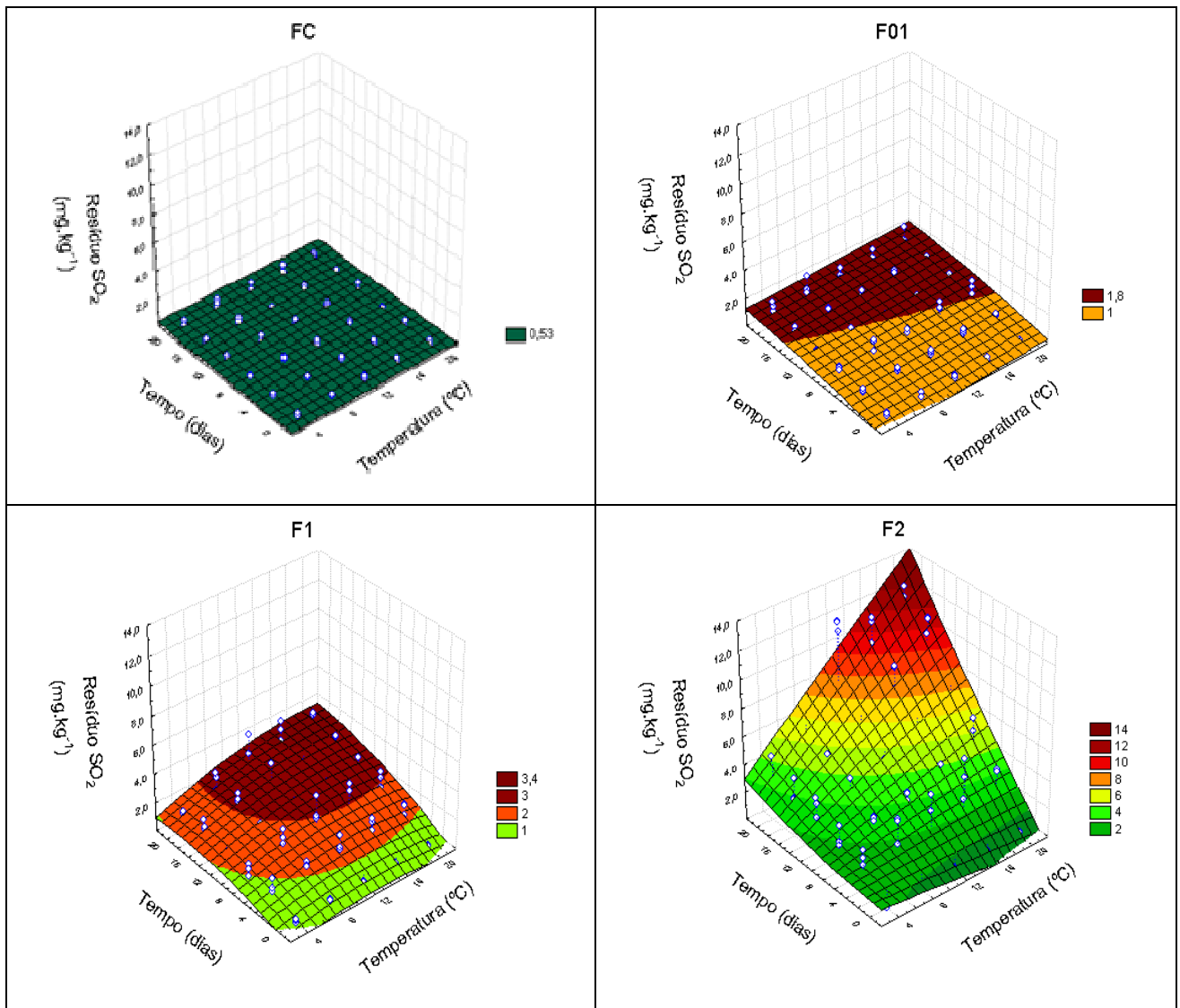
5.9.4 Resíduo de SO₂

A Figura 31 apresenta as superfícies de respostas para o parâmetro resíduo de SO₂ em função do tempo e temperatura de armazenamento. Os resultados apresentam-se bastante satisfatórios, pois a migração está abaixo do limite permitido do aditivo SO₂ para polpas de frutas 0,03g.100g⁻¹ de produto (BRASIL, 2005) e da migração da embalagem para o alimento que cita como limite 10 mg.kg⁻¹ (BRASIL, 2008).

De maneira geral, a análise estatística revelou que os tratamentos, a temperatura e o tempo de armazenamento influenciaram na liberação do aditivo a partir do filme para as

amostras de maçãs ($p < 0,05$), com um aumento gradual do conteúdo de SO_2 residual em função do aumento desses parâmetros. Entre os tratamentos, todos diferem entre si ($p < 0,05$). Já para a variável temperatura, o resíduo de SO_2 não variou significativamente entre 4 °C e 8 °C, porém 4 °C difere de 12, 16 e 20 °C. A temperatura de 8 °C difere de 16 e 20 °C, apresentando concentrações residuais superiores nas temperaturas mais elevadas. Geralmente, o aumento na temperatura acelera a migração de agentes ativos do filme para o alimento (WONG et al., 1996).

Figura 31 - Superfícies de respostas para o parâmetro resíduo de SO_2 (mg.kg^{-1}) em função do tempo e temperatura de armazenamento para os tratamentos FC, F01, F1 e F2.



Para os tratamentos FC, F01 e F1, valores residuais de SO₂ ficaram abaixo de 4 mg.kg⁻¹ para todas as temperaturas e tempos de armazenamento. Para o filme com a maior concentração de agente adicionado (F2), após 16 dias de armazenamento, a amostra armazenada a 12 °C mostrou teor residual de 10,75 ± 0,62 mg.kg⁻¹. No final do período de armazenamento de 20 dias, as amostras armazenadas à temperatura de 12, 16 e 20 °C apresentaram valores de 11,7 ± 0,38, 10,43 ± 0,96 e 10,67 mg.kg⁻¹ ± 2,32, respectivamente, estando acima do limite estabelecido pela legislação. Portanto, algumas condições de armazenamento foram inadequadas em termos de toxicologia e segurança alimentar.

Com relação ao tempo de armazenamento, foram verificadas diferenças significativas (p <0,05) entre os dias 4, 16 e 20, influenciando no aumento do resíduo de SO₂ com o período de estocagem.

Neste estudo, foram encontrados para as temperaturas 12, 16 e 20 °C, a partir dos 16 dias de armazenamento, valores entre 10 e 14 mg.kg⁻¹, o que tornaria o produto impróprio para consumo, conforme a lista positiva de aditivos para materiais poliméricos (BRASIL, 2008), uma vez que o sulfito em excesso pode causar problemas à saúde (XING et al., 2011). Já para temperaturas de 4 e 8 °C, as quais são utilizadas para o armazenamento comercial destes produtos, apresentaram valores dentro dos limites estabelecidos durante os 20 dias de armazenamento, mesmo para o filme F2.

No caso do filme F1, os valores são satisfatórios, já que não ultrapassam o limite legal, independente do tempo e da temperatura. Sendo assim, é possível demonstrar a importância da embalagem ativa que permite um controle do escurecimento com uma migração do sulfito menor do que o permitido pela legislação, diminuindo assim os níveis de sulfitos que serão ingeridos pelo consumidor, proporcionando conservação ao produto.

5.9.5 Avaliação da vida de prateleira

Alguns países dispõem de legislações específicas com limites máximos da presença de micro-organismos em alimentos para definir a vida de prateleira de seus produtos. No Brasil, como não existe uma legislação específica, muitos trabalhos preconizam o valor de 1,0x10⁶

UFC.g⁻¹ como um limite de qualidade para estimar a vida de prateleira dos alimentos (MAISTRO et al., 2012).

Assim, se considerou este, como sendo o limite aceitável da população dos micro-organismos psicrotróficos nas maçãs minimamente processadas, juntamente com os resultados do teor residual de SO₂ (< 10 mg.kg⁻¹) de acordo com a lista positiva de aditivos incorporados a materiais poliméricos (BRASIL, 2008). Pelos resultados observados na Tabela 12 e na Figura 31, com relação a contaminação microbiológica, até o quarto dia de armazenamento todos os filmes apresentaram-se dentro dos limites quando as amostras foram armazenadas entre 4 °C e 8 °C apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis (até 6 ciclos logarítmicos), e somente o filme F2 mantinha-se dentro dos limites. No oitavo dia de armazenamento, todas as amostras armazenadas a 4 °C e as amostras F1 e F2, armazenadas a 4, 8 e 12 °C, mantiveram qualidade microbiológica própria. A partir do décimo segundo dia até o vigésimo, somente o filme F2, na temperatura de 4 °C apresentou qualidade microbiológica dentro dos limites aceitáveis, porém a partir de 16 °C os limites residuais de SO₂ ultrapassaram o limite da legislação.

Sendo assim, a Tabela 14 apresenta um mapeamento dos valores das análises de contaminação microbiológica e química, onde é possível informar sob o ponto de vista de segurança alimentar que as amostras envolvidas no filme F2 e estocadas na temperatura de 4 °C, apresentaram estabilidade microbiológica e toxicológica durante os 20 dias de armazenamento, não ultrapassando 10⁶ UFC.g⁻¹ para a contaminação microbiológica, bem como o limite residual de SO₂.

Porém, é importante destacar as temperaturas superiores, como as de 8 °C, que estão mais próximas das condições de comercialização de vegetais minimamente processados, onde, mesmo filme (F2) apresenta condições próprias para consumo até 12 dias de armazenamento a 8 °C, quando atinge o limite de contaminação microbiológica em 6 ciclos logarítmicos, mantendo-se dentro dos limites residuais de SO₂, mas deve-se considerar uma margem de segurança, onde definiu-se portanto 10 dias de armazenamento a 8 °C.

Tabela 14. Mapeamento dos valores de contaminação microbiológica (contagem de psocrotróficos) e química (residual de SO₂), considerando, respectivamente, os limites de 6 log UFC.g⁻¹ e 10 mg.kg⁻¹. Os filmes destacados em vermelho indicam os valores que excederam os limites da legislação.

Temperaturas	4 °C	8 °C	12 °C	16 °C	20 °C
Tempos	Contaminação microbiológica				
Zero	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Quatro	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Oito	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Doze	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Dezesseis	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Vinte	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Tempo	Contaminação química (residual de SO₂)				
Zero	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Quatro	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Oito	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Doze	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Dezesseis	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2
Vinte	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2	FC, F01, F1, F2

6 CONCLUSÕES

Do trabalho realizado foi possível verificar a potencialidade da aplicação do *MBSK* em filmes com o objetivo de torná-lo ativo contra o escurecimento enzimático e atividade microbiológica em maçãs minimamente processadas. Este agente ativo, eficiente na redução de crescimento celular de micro-organismos de importância em alimentos, mostrou uma direção promissora no que diz respeito à segurança alimentar e ao aprimoramento tecnológico para a conservação de alimentos. Da mesma forma, observou-se que as concentrações testadas de *MBSK* foram eficientes na redução da taxa de escurecimento enzimático provocado pela enzima polifenoloxidase, o que foi reforçado pelos resultados da determinação dos parâmetros instrumentais de cor.

As embalagens com liberação controlada representam uma nova geração de materiais que atuam como um sistema de distribuição de compostos ativos (em diferentes taxas controladas), protegendo o alimento de micro-organismos deteriorantes e contaminantes, aumentando a segurança e melhorando a qualidade durante o armazenamento em condições de refrigeração. O aditivo que migra lentamente para o produto, age superficialmente, prolongando a vida de prateleira sem adição excessiva do composto no alimento.

O encapsulamento via método sol-gel é apresentado como uma técnica potencial para a conservação e melhoria das propriedades de aditivos alimentares, em particular no que diz respeito às substâncias termolábeis, favorecendo as condições de tratamento térmico no fabrico de filmes poliméricos, pois a resistência térmica aumentou em 50 °C, permitindo a realização do processo de extrusão do filme.

A incorporação do aditivo misto aos filmes nas quantidades avaliadas não afetou as condições de maquinabilidade, embora o aumento da concentração tenha permitido variações sobre as propriedades mecânicas e morfológicas, não sendo observadas mudanças nas propriedades térmicas do PVC.

Com relação à eficiência do agente encapsulado quando incorporado com a matriz polimérica, viu-se que houve diminuição de potencial inibitório em relação ao aditivo puro, porém, com maior resistência térmica e controle do efeito residual no alimento. Assim, a

migração do agente ativo, oriunda da embalagem para o alimento, indicou uma redução do potencial toxicológico do aditivo, permanecendo dentro do limite máximo de resíduo.

A análise multifuncional dos filmes ativos produzidos apresentou efeito satisfatório para a manutenção da cor e qualidade microbiológica, bem como da segurança toxicológica em até 12 dias a 8 ° C (F2). Isto representa um aumento de até oito dias na vida de prateleira de maçãs cortadas. No que diz respeito à manutenção da cor, as concentrações de 1 e 2% incorporadas nos filmes foram eficazes.

Deste modo conclui-se que os filmes multifuncionais contendo ativos *MK* e *MKE* apresentam-se como uma boa alternativa para o armazenamento de vegetais minimamente processados.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar outros agentes ligantes ao suporte sílica para encapsulação, uma vez que dos 12 agentes ligantes testados, somente o aminopropil apresentou efeito inibitório.

Avaliar o acondicionamento em filmes de polietileno a vácuo, visando acelerar a liberação de SO₂ ou ainda utilizando o sistema de acondicionamento em multicamadas.

Testar a incorporação nos filmes com diferentes proporções do aditivo misto, uma vez que foram testadas partes iguais do aditivo puro e encapsulado.

Avaliar a cinética de liberação do aditivo incorporado aos filmes, pois pode haver um diferente comportamento da migração para o alimento.

Realizar a análise sensorial dos produtos para teste de aceitabilidade.

Analisar o ciclo de vida do produto (filme).

Testar a eficiência dos filmes em outros vegetais minimamente processados.

Analisar a influência do aditivo em maçãs contaminadas com patulina.

Avaliar o custo de produção do filme ativo.

REFERÊNCIAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C; VINÃS, I. Microbiological quality of fresh minimally-processed fruit and vegetables and sprouts from retail establishments. **International Journal of Food Microbiology**. Elsevier, Science Direct, v. 123, p: 121-129. 2008.

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. **Compêndio da Legislação Brasileira de Alimentos**, seção 3.31, 2001.

ABREU, L. F.; FARIA, J. A. F. Influencia da temperatura e do ácido ascórbico sobre a estabilidade físico-química e atividade enzimática da água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada assepticamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27 (2). p. 226-232, abril-junho, 2007.

AHMED, J.; SHIVHARE, U. S.; KAUR, M. Thermal colour degradation kinetics of mango puree. **International Journal of Food Properties**, v. 5, n. 2, p. 359-366, 2002.

AHVENAINEN, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, n. 6, p.179-187, 1996.

AHVENAINEN, R. Active and intelligent packaging in Part I: Types and roles of active and intelligent packaging. Novel food packaging techniques, **Food Science and Technology**. Woodhead publishing limited, Cambridge, Ahvenainen, R. (ed), 2003.

ALLENDE, A. ARTÉS, F. Combined ultraviolet-C and modified atmosphere packaging treatments for reducing microbial growth of fresh processed lettuce. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v. 36, p. 779-786. 2003.

ALMENAR, E., DEL VALLE, V., CATALA, R. Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry** v. 55, p. 2240-2245, 2007.

ALVAREZ, M. F. Revisión: Envasado activo de los alimentos. **Food Science ant Technology**. v. 6, n. 2, p. 97-108, 2006.

ALVES, R. M. V., OLIVEIRA, L. M.; COLTRO, L., GARCIA, E. E. C.; SARANTOPOPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M. **Ensaio para a avaliação de embalagens plásticas rígidas**. Campinas: CETEA/ITAL. 224 p, 1998.

ALZAMORA, S. M. ; TAPIA, M. S.; WELTI CHANES, J. New strategies for minimally processed foods. the role of multitarget preservation. **Food Science and Technology International**. Aspen Publishers v.4, n. 5. ed. p: 353-361. 1998.

AMERICAN Society Standard Testing and Materials – ASTM. **Standard Practice for Conditioning Plastics and Electrical Insulating Materials form testing – D618-95**. Philadelphia: ASTM, 3p.1996.

AMERICAN Society Standard Testing and Materials – ASTM. **Standard specification for standard atmosphere for conditioning and testing flexible barriers materiais – E171-94**. Philadelphia: ASTM, 1p.1996.

AMERICAN Society **Standard Testing and Materials, Standard test methods for tensile proprieties of thin plastic sheeting. D 882-02**. Philadelphia, Pa: ASTM, 10p. 2002.

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists; **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18th Ed. 2 v. Gaithersburg, MD, 2006.
- APHA - American Public Health Association. In Downes & Ito (Eds.). **Compendium for the Microbiological examination of Foods** (4 th ed.) Washington. 676 p. 2001.
- APPENDINI, P., HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 3, p 113-126, 2002.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa: UFV, 478 p. 2008.
- ARORA, A.; PADUA, G. W. Review: Nanocomposites in Food Packaging. **Journal of Food Science**. v. 75, n. 1, 2010.
- ARTÉS, F.; CASTANER, M. GIL, M. I. Revisión: El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas minimamente procesadas. **Food Science and Technology International**. Aspen Publishers v.4, n. 6. p: 377-389. 1998.
- ARTÉS, F.; GOMÉZ, P. A.; ARTÉS-HERNANDEZ, F. Physical, Physiological and Microbial Deterioration of Minimally Fresh Processed Fruits and Vegetables. **Food Science and Technology International**. v. 13, n. 3. p: 177-188. 2007.
- AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F., AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 20, n.3. Campinas, set/dez, 2000.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 16, n. 1. p: 89-97, jan/mar, 2005.
- BAE, E.; CHAH, S.; YI, J. Preparation and Characterization of Ceramic Hollow Microspheres for Heavy Metal Ion Removal in Wastewater. **Journal of colloid and interface science**, n. 230, p. 367-376. 2000.
- BALAGUÉ, C.; KHAN, A. A.; FERNANDEZ, L.; REDOLFI, A. L.; AQUILI, V.; VOLTATTORNI, P. Occurrence of non O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. **Food Microbiology**, n. 23, p. 307-313. 2006.
- BARACAT, R. S. **Avaliação do processo por embalagem do tipo atmosfera modificada na conservação da carne bovina porcionada**. Tese. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo USP – Pirassununga - SP. 2006.
- BELTRAME, P.; CITTERIO, C.; TEST, G.; & SEVES, A. - **Journal Polymeros Science.**, v. 74, p.1941, 1999.
- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1926-1933, 2009.
- BILLAUD, C.; ROUX, E.; BRUN-MÉRIMÉE, S.; MARASCHIN, C.; NICOLAS, J. Inhibitory effect of unheated and heated d-glucose, d-fructose and l-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods. **Food Chemistry**, London, v.81, n.1, p.35–50, 2003.
- BISESSUR, J.; PERMAUL, K.; ODHAV, B. Reduction of patulin during apple juice clarification. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.8, p.1216-1219, 2001.
- BODAGHI, H., MOSTOFI, Y., OROMIEHIE, A., ZAMANI, Z., GHANBARZADEH, B., COSTA, C., CONTE, A., DEL NOBILE, M. A. Evaluation of the photocatalytic

antimicrobial effects of a TiO₂ nanocomposite food packaging film by in vitro and in vivo tests. . **LWT - Food Science and Technology**, v. 1-5, 2012.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M.; FONTES, E. A. F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas v. 27 n. 1. p: 32-38. jan/mar. 2007.

BRACKETT, R. E., SPLITTSTOESSER, D. F. Fruits and Vegetables. In: Downes, F. P., Ito, K. (Eds). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 515-520. 2001.

BRAMBILLA, R., SILVEIRA, F., SANTOS, J. H. Z. Investigating morphological changes on octadecyl modified-silicas by SEM and AFM. **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**. A Mendez-Vilas and J Diaz (Eds). p 626-633. Formatex 2007.

BRAMBILLA, R.; POISSON, J.; RADTKE, C.; MIRANDA, M. S. L.; CARDOSO, M. B.; BUTLER, I. S.; SANTOS, J. H. Z. *Sol-gel* preparation of aminopropyl-silica-magnesia hybrid materials. **Journal Sol-Gel Science Technology**, n. 59, p. 135-144, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa N. 1 de 7 de Janeiro de 2000. **Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas**. Diário Oficial da união, N. 6. Brasília, 10 de janeiro de 2000. Seção 1, p. 54-58. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. ANVISA. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em 14 de agosto de 2011. 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa n° 62**, de 26 de agosto de 2003. Métodos de Análises Microbiológicas para alimentos e água. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA. Resolução n°. 217, de 29 de julho de 2005. **Dispõe sobre a aprovação da extensão de uso do aditivo dióxido de enxofre e seus sais de cálcio, sódio e potássio**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 01 agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 2005 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 17, de 17 de março de 2008. **Anexo Lista positiva de aditivos para materiais poliméricos destina à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. 2008.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre a extensão de uso do aditivo INS 223 metabissulfito de sódio na função de conservador para tratamento de superfície de uvas *in natura*, com limite máximo de 0,001 g/100g (como SO₂ residual)**. Resolução N° 12, de 7 de Março de 2008 b.

BRASKEM. **Efeito dos Plastificantes na dureza dos compostos de PVC**. Boletim Técnico n. 1 Revisão Julho, 2002.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. *Sol-gel science. The physics and chemistry of sol-gel processing*, San Diego: Academic Press Inc. 1990.

- BRODY, A. L. (Contributing Editor). What's Active in Active Packaging [Versão electrónica]. **Food Technology**. September 2001 vol 55, no. 9. Retirado em 07-10-03 de http://www.ift.org/publications/docshop/ft_shop/09-01/09_01_pdfs/09-01-p&t-pkg.pdf . 2001.
- CAHAN, R., GOLDSTEIN, V., FINKELSTEIN, B. Development of the novel active packaging film preventing migration of antimicrobial component. The College of Judea and Samaria, **The Research Institute**, Israel. Disponível em: <http://www.ariel.ac.il/management/research/pf/zinigrad/mmt/MMT-2002/Papers/Section_4/4_85-89.doc> Data de acesso 17/09/2010. 161. 2002.
- CALEB, J. O.; MAHAJAN, P. V. AL-SAID, F. A.; OPARA, U. L. Modified Atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and microbial consequences – A review. *Journal Food and Bioprocess Technology*. July 2012.
- CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- CANTOS, E.; TUDELA, J. A.; GIL, M. I. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 3015-3023, 2002.
- CAPELETTI, L. B. **Efeito da rota *sol-gel* no encapsulamento de indicadores colorimétricos e fluorimétricos e em suas performances como sensores de pH e gás amônia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Curso de Pós Graduação em Química. Dissertação, 2010.
- CAPELETTI, L. B.; BERTOTTO, F. L.; SANTOS, J. H. Z.; MONCADA, E.; CARDOSO, M. B. The effect of the *sol-gel* route on the characteristics of acid-base sensors. **Sensors and actuators B**. v. 151, p 169-175, 2010b
- CAPELETTI, L. B.; RADTKE C.; SANTOS, J. H. Z.; MONCADA, E.; ROCHA, Z. N.; PEPE, I. M. On the interaction of encapsulated pH indicator species within a sílica matrix produced by three *sol-gel* routes. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects**, v. 392, p 256-263, 2011.
- CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM, H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidase e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**. Maringá, v. 25, n. 1. p: 189-193, 2003.
- CAROVIC-STANKO, K. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v.119, p.196-201, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.010>>. Data de acesso: Mar. 5, 2012. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.06.010. 2010.
- CHITARRA, M. I. F. **Processamento mínimo de frutos e hortaliças**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.
- CHURCH, I. J.; PARSONS, A. L. Modified Atmosphere Packaging Technology: A Review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, n. 2, p. 143-152, 1995.
- COELHO, S. F. L. **Efeito de Diferentes concentrações de conservantes alimentícios no crescimento in vitro de fungos termorresistentes e bactérias patogênicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Maceió, 2008. 79 p. 213
- CRUMIÉRE, F. **Inhibition of enzymatic browning in food products using bio-ingredients**. Thesis (Master of Science) Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal. 2000.

CUNHA, G. M. A.; ALVES, J. K. P.; JUNIOR, W. M. A.; DUARTE, W. K. C.; MAGALHÃES, M. M. A. **Estudo da cinética de inativação térmica da peroxidase presente na polpa de goiaba**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2005.

DAINELLI, D; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**. v. 19, n. 1, p. 103-102. 2008.

DE BONA, J. C. **Preparação e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Blendas de Amido com Polietileno**. Dissertação- Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC. 2007.

DEL NOBILE, M. A., CONTE, A., INCORONATO, A. L. PANZA, O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**. v. 89, p. 57-63. 2008.

DEPYPERE, F. et al. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. *Appl. Biotechnol.* **Food Science Pol.**, v.1, n.2, p.75-94, 2003.

DIPERSIO, P. A.; KENDAL, P. A.; SOFOS, J. N. Inactivation of *Listeria monocytogenes* during drying and storage of peach slices treated with acidic or sodium metabisulfite solutions. **Food Microbiology**, n. 21, p 641-648, 2004.

DUBEK, P. Nanostructure as seen by the SAXS. **Vacuum**. n. 80, p 92-97, 2005.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, n.4, p.136-151, 1988

EISSA, H. A.; FADEL, H. H. M.; IBRAHIM, G. E.; HASSAM, I. M.; ELRASHID, A. A. Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. *Food Research International*, n. 39, p 855-863, 2006.

EL AMIN, AHMED. Nanotechnology targets new food packaging products. 12/outubro/2005. Disponível na internet www.sustainpack.com/news.php?id=39 Acesso 13/fev/2006. 2005.

ELASHMAWI, I. S.; HAKEEM, N. A.; MAREI, L. K.; HANNA, F. F. Structure and performance of ZnO/PVC nanocomposites. **Physica B**. n. 405, p 4163-4169, 2010.

ENDO, E.; SOARES, N. de F. S.; SANTOS, D. A. A. dos.; BORGES, S. V.; FONTES., E. A. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Alterações físicas e físico-químicas de batatas (*Solanum tuberosum* L.) minimamente processadas intercaladas com diferentes filmes ativos. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. v. 17, n. 3. p: 239-249, jul/set. 2006.

ENDO, E.; SOARES, N. de F. S.; SANTOS, D. A. A. dos.; BORGES, S. V.; FONTES., E. A. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Uso de filmes ativos na conservação de batata minimamente processada. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina. v. 29, n. 2. p. 349-360, abr/jun. 2008.

ESKIN, N.A.N. Biochemical changes in raw foods: fruits and vegetables. In: **Biochemistry of Foods**. San Diego : Academic Press, p.71-165. 1991.

ESTEVEES, A. C. C., BARROS-TIMMONS, A., TRINDADE, T. Nanocompositos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p 798-805, 2004.

EXAMA, A.; ARUL, J.; LENCKI, R. W.; LEE, L. Z.; TOUPIN, C. Suitability of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 6, p. 1365-1370, Nov./ Dec. 1993.

EZHILARASI, P. N., KARTHIK, P., CHHAN N., ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**. DOI 10.1007/s11947-012-0944-0, 2012.

FABECH, B.; HELLSTROM, T.; HENRYSDOTTER, G.; NILSSON, J.; RÜDINGER, L.; SOLLI, E.; SVENSSON, K.; THORKESSON, A.; TUOMAALA, V. **Active and Intelligent Food Packaging** – A Nordic report in the legislative aspects. 2005.

FAGUNDES, C. **Estudo cinético do processamento mínimo de maçã (*Malus domestica* B.) Var. gala: influência da temperatura na taxa respiratória e nos parâmetros físico-químicos e sensoriais**. Dissertação de Mestrado, Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

FAN, X.; SOKORAI, K. J. B.; LIAO, C. H.; COOKE, P.; ZHANG, H. Q. Antibrowning and Antimicrobial Properties of Sodium Acid Sulfate in Apple Slices. **Journal of Food Science**. v. 74, n. 9. 2009.

FANTUZZI, E; PUSCHMANN, R; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p. 207-211, 2004.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. **Drug development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 979 – 993 1998.

FERNANDES, T. D. B. **Desenvolvimento e caracterização de filme polimérico ativo para embalagens de frutas e hortaliças**. Campinas, SP: Dissertação de Mestrado Engenharia Química- Unicamp. 2001.

FERNANDES, P. L. O., SILVA, L. T.; FONTES, L. O. Escurecimento enzimático em Vegetais minimamente processados e seus métodos de controle. **Revista Verde**. v. 5, n. 2, p. 21-27. Mossoró, abril/junho 2010.

FRANCO. B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 2005.

FRONZA, N. **Filmes poliméricos com adição de agente antimicrobiano a base de prata: desenvolvimento, caracterização e aplicação em cortes de carne bovina**. Tese. Departamento de Engenharia Química - UFSC. Florianópolis, SC. 2009.

GALIC, K., SCETAR, M., KUREK, M. The benefits of processing and packaging. **Trends in Food Science & Technology**. v. 22, p: 127-137, 2011.

GARCIA, E.; BARRETT, D. M. Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. In: LAMIKANRA, O. (Ed.). Fresh cut fruits and vegetables: **Science, Technology and Market**. USA: CRC Press. p. 268-297, 2002.

GIBBS, B.F.et al. Encapsulation in the food industry: a review. **Int. Journal Food Science Nutrition**, v.50, p.213-224, 1999.

GIL, L. M. F. **Estudo da taxa respiratória e de indicadores da qualidade de cebola vermelha (*Allium cepa* L. “Vermelha da Povoá”) minimamente processada**. Dissertação. Mestrado Universidade Aberta. Porto, 2008.

HAMINIUK, C. W. I.; OLIVEIRA, C. R.G.; BAGGIO, E. C. R.; MASSON, M. L. Pré-treatments effects on browning of Fuji and gala Apple cultivars after freezing. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v. 29, n. 5. p. 1029-1033, 2005.

- HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food technology**, v. 54, n.3, p. 56-65, 2000.
- HAN, J.H. **Antimicrobial Food Packaging**. In_ AHVENAINEN, RAIJA. Novel food packaging techniques. CRC Press – Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra. 2003.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 5^a edição, Rio de Janeiro, LTC, 2001.
- HARRISON, M. A. Presence and stability of patulin in apple products: a review. **Journal of Food Safety**, Westport, v.9, n.3, p.147-153, 1989.
- HENCH, L. L.; WEST, J. K. The *Sol-Gel* Process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33-72. 1990.
- IFPA - INTERNATIONAL FRESH-CUT PRODUCE ASSOCIATION. **Food safety guidelines for the fresh-cut produce industry**. 4. ed. [S.I.], 213 p. 2001.
- IYENGAR, R.; MCEVILY, A. J. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 60-64, 1992.
- IYIDOGAN, N. F.; BAYINDIRH A. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4 hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. **Journal of Food Engineering** n. 62, p. 299-304. 2004.
- JACXSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce **Postharvest Biology and Technology** v. 26 p. 59–73. 2002.
- JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E.; BHANDARNI, B.; HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International** 41, 172-183. 2008.
- JANOVITZ-KLAPP, A. H.; RICHARD, F. C.; GOUPY, P. M.; NICOLAS, J. J. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.38, n.4, p.926-931, 1990.
- JAROSZYNSKA, D.; KLEPS, T.; GDOWSK-TOTAK, D. Investigation of thermal degradation of polymers containing chloride by thermogravimetry. **Journal Thermal Analysis**, v. 19, p. 69-78. 1980.
- JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 4^a Ed. Chapman & Hall, New York, 1992.
- JONG, A. R.; BOUMANS, H.; SLAGHEK, T.; VEEN, J.; RIJK, R.; ZANDVOORT, M.N. Active and intelligent packaging for food: Is it the future? **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 10, p. 975-979, 2005.
- JUNQUEIRA, M. S. **Indústria: Embalagens Ativas na Prevenção do Escurecimento Enzimático de Batatas Minimamente Processadas**. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. Batata Show. Edição 22 dezembro 2008, ano 8.
- JUNQUEIRA, M. S.; SOARES, N. de F. F.; REIS, R. C.; CARNEIRO, J. de D. S.; BENICIO, R. T.; YOKOTA, S. R. C. Efeito de embalagens ativas no escurecimento enzimático de batatas (*Solanum tuberosum*) fatiadas e minimamente processadas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3. p: 613-618, jul/dez. 2009.
- KANG, J. S.; LEE, D. S. A kinetic model for transpiration of fresh produce in a controlled atmosphere. **Journal of Food Engineering** v. 35, p. 65-73. 1998.
- KARAGOZLU, N., ERGONUL, B., OZCAN, D. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. **Food Control**. v. 22, p 1851-1855, 2011.

KHADEMI, O.; SALVADOR, A.; ZAMANI, Z.; BESADA, C. Effects of hot water treatments on antioxidant enzymatic system in reducing flesh browning of persimmon. **Food and Bioprocess Technology**. September, 2012.

KICKELBICK, G. The search of a homogeneously dispersed material – the art handling the organic polymer/metal oxide interface. **Journal Sol-Gel Science Technology**, 46, 281. 2008.

LABUZA, T. P. An introduction to active packaging for foods. **Food Technology**, v. 50, n. 1, p. 68-71, 1996.

LACOSTE, A., SCHAICH, K. M., ZUMBRUNNEN, D. et al. Advancing controlled release packaging through smart blending. **Packaging Technology and Science**, v. 18, p: 77-87, 2005.

LEAL, T. C. A. et al. Ausência de *Y. enterocolitica* em alimentos e reservatórios animais, em áreas do Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30 n. 3, p. 193-196, mai-jun, 1997.

LECLERCQ, C. MOLINARO, M. G.; PICCINELLI, R.; BALDINI, M.; ARCELLA, D.; STACCHINI, P. Dietary Intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulfite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. **Food Additives and Contamination**. Basingstoke, v. 17, n. 12, p. 979-989, 2000.

LEE, C. Y. Enzymatic Browning Reaction. In: FRANCIS, F. J. **Encyclopedia of Food Science and Technology**. 2nd. ed., New York: John Wiley & Sons, v. 1, p. 208-218 2000.

LEE, J. Y., PARK, H. J., LEE, C. Y. et al., Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *Lebensm.-Wiss. U. Food Science and Technology*. v. 36 n. 3, p. 323–329, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier. 839 p. 1995.

LI, Y.; ZHAO, M. Simple methods for determination of sulfites in food products. **Food Control**, 17, p 975-980, 2006.

LIMA, A. S.; RAMOS, A. L. D.; MARCELLINI, P. S.; BATISTA, R. A.; FARAONI, A. S. Adição de agentes antiescurecimento, antimicrobiano e utilização de diferentes filmes poliméricos, em mamão minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, SP, v. 27, n. 1, p. 149-152, abril, 2005.

LINDBLOOM, B. J.. **CIE Color Calculator** 2004. Disponível em <http://www.brucelindbloom.com>>. Acesso em 21 de setembro de 2011.

LOPES, A. S.; CLEMENTE, E. **Isolamento e Caracterização de Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em brócolos (*Brassica oleracea* L Cv. *Italica*)**. XI Encontro Anual de Iniciação Científica. Maringá. 2002.

LOPEZ-GALVEZ, F., GIL, M. I., TRUCHADO, P. et al. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. **Food Microbiology** v. 27, p. 199-204. 2010.

LOPEZ-NICOLAS, J.; NUNEZ-DELICADO, E.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GARCIA-CARMONA, F. Kinetic modelo f Apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosyl-cyclodextrin as secondary antioxidant. **Food Chemistry**. Elsevier, Science Direct v. 101. p: 116-17. 2007.

- LU, S.; LUO, Y. TURNER, E. FENG, H. Efficacy of Sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. **Food Chemistry**. v. 104. p. 824-829. 2007.
- LÜCK, E.; JAGER, M. Sulfur Dioxide, Chapter 12 in: **Antimicrobial Food Additives** – characteristics, uses, effects. 2nd Edition – Berlin: Springer-Verlag, 260p. 1997.
- LUO, Y.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Enzymatic browning and its inhibition in new Apple cultivars slices using 4-hexylresorcinol in combination with ascorbic acid. **Food Science and Technology International**. Chapman e Hall v.3, p. 195-201. 1997.
- LUO, Y.; LU, S.; ZHOU, B.; FENG, H. Dual effectiveness of sodium chlorite for enzymatic browning inhibition and microbial inactivation on fresh cut apples. **Food Science and Technology** v. 44, p. 1621-1625. 2011.
- MA, S., SILVA, J. S. HEARNSBERGER, J. O.; GARNER JR, J. O. Prevention of Enzymatic Darkening in frozen swett potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by water blanching: relationship among darkening, phenols, and polyphenol oxidase activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**. Elsevier. v. 40. p: 864-867. 1992. 16
- MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 9, n. 4. p: 265-275. out-dez. 2006.
- MAISTRO, L. C., MIYA, N. T. N.; SANT´ANNA, A. S.; PEREIRA, J. L. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP – Brazil, as assessed by tradicional and alternative methds. **Food Control**, v. 28, p 258-264, 2012.
- MARILYN, B. The Wiley **Encyclopedia of Packaging Technology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 475p. 1986.
- MARSHALL, M. R.; KIM, J.; WEI, C. I. **Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafood's**. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/Ags/agsi/ENZYMEFINAL/Enzymatic%20Browning.html>>. Acesso em: 02 de novembro de 2010.
- MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R. Effect of modified atmosphere packaging on the quality of fresh-cut fruits. **Stewart Postharvest**, v. 2, n. 1, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.stewartpostharvest.com>>. Acesso em: 02 jun. 2006.
- MARTINEZ, M.V., WHITAKER, J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, n.6, p.195-200, 1995.
- MAURIELLO G.; DE LUCA E.; LA STORIA A.; VILLANI F.; ERCOLINI D. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. **Letters in applied microbiology**. v. 41, no6, p: 464-469. 2005.
- MELO, N. R. **Migração de plastificantes e avaliação de propriedades mecânicas de filmes de poli(cloreto de vinila) para alimentos**. Tese do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Viçosa/MG, 2007.
- MENG, X.; LI, B.; LIU, J.; TIAN, S. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chemistry**, v. 106, p 501-508, 2008.
- MISTRY, Y. **Development of LDPE-based Antimicrobial Films for food Packaging**. Tese. **Packaging and Polymer Research**. Unit School of Molecular Science Faculty of Health, Engineering and Science Victoria University Australy., July, 2006.
- MONCADA, E. A. Nanotecnologia, aplicaciones em embalajes para alimentos y productos farmacêuticos. **Vitae Revista de La Facultad de Química Farmacêutica**, Medellin, Colombia. v. 14, n. 2, 2007.

- MOURA, S.C.S.R.; BEBARI, S. A.; GERMER, S. P. M.; ALMEIDA, M. E. M.; FEFIM, D. A. Determinação da vida-de-prateleira de maçã-passa por testes acelerados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 141-148, 2007.
- MURIEL-GALET, V.; CERISUELO, J. P.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; LARA, M. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. **International Journal of Food Microbiology**, 157. p 195-201, 2012.
- NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NGUYEN C; CARLIN F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 34, p. 371-401. 1994.
- NOGUEIRA, J. N.; SILVA, E. **Efeito comparativo do calor, SO₂ e ácido ascórbico na atividade da polifenoloxidase e peroxidase de algumas frutas e hortaliças**. Anuário ESALQ. Piracicaba. v 46, n. 2. p: 453-471. 1989.
- NOGUEIRA, F. C. C. **Caracterização de Filme Ativo Polimérico com Absorvedor de Oxigênio para Uso em Embalagens**. Dissertação. Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2005.
- NOVOKSHONOVA, L. A.; KOVALEVA, N; USHAKOVA, T. M., et al. Partially hydrolized alkylaluminums as the active heterogeneized components of metallocene catalyst. **Kinetics and Catalysis**. v. 46, p. 853-860. 2005
- NUNES, L. R. Concepção e org.; RODOLFO JUNIOR, A. coord. **Tecnologia do PVC**. São Paulo: ProEditores / Braskem, 2002. 2a edição revista e ampliada. 448 p. 2006.
- OETTERER, M. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Ed. Manole. Barueri, SP. 2006.
- OLIVAS, G. I.; MATTINSON, BARBOSA-CÀNOVAS, G. V. Alginate coating for preservation of minimally processed Gala apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 89-96, 2007.
- OLIVEIRA, L. M. Embalagens ativas e inteligentes para produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, v. 329, 2004.
- OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A P. L. V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 161-165, julho – dezembro, 2004b.
- OLIVEIRA, T. DE; SOARES, N. de F. S.; PAULA, C., D. de.; VIANA, G. A. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Ciências Agrárias**. Londrina. v. 29, n.1, p. 117-128, jan-mar, 2008.
- OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antioxidant Content of Fresh-cut Pears Stored in High-O₂ Active and Passive Modified Atmosphere Packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 932-940, 2008.
- ORDÓÑEZ, J. A. Componentes dos alimentos e processos. **Tecnologia de Alimentos**. v. 1 p.157-158. 2005.
- OUGH, C. S. Determination of sulfur dioxide in grapes and wines. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, n. 1, p. 5-7, 1986.

- OZÓRIO, R. Á. **Elaboração e caracterização de micro partículas de astaxantina com quitosana**. Dissertação/Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 101 p. 2007.
- PÁDUA, R. A. F. D. E.; MACHINSKI, J. M. Aspectos toxicológicos e ocorrência de patulina em suco de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 26, n. 4, p. 535-542, out./dez. 2005.
- PELCZAR J. R. J. M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 2005.
- PEREIRA, R. M.; BOTREL, D. A.; FRAGA, K. de F.; SOARES, N. F. F.; FONTES, E. A. F. Avaliação da qualidade de queijo tipo gorgonzola envolvido com filme antimicrobiano laminado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 61, n. 351, p. 144-147, 2006.
- PEREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; RÍO, M. A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrated-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, n. 39, 84-92 p. 2006.
- PÉREZ-PÉREZ, C.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. A.; BARBOSA-RODRÍGUEZ, J. R.; VILLASENOR-ORTEGA, F. Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**. v. 37, n. 661 (2), p. 193-216, 2006.
- PINELI, L. L. O.; MERETTI, C. L.; ALMEIDA, G. C.; NASCIMENTO, A. B. G.; ONUKI, A. C. A. Associação de atmosfera modificada e antioxidantes reduz o escurecimento de batatas “Agata” minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**. Brasília. v. 23, n. 4. p: 993-999. out/dez. 2005.
- PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H.; CAMILLOTO, G.; CAMPOS, B. P. Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation. **Packaging Technology & Science**. n.7, p. 375-383, 2008.
- PIRES, G. P. **Implicações da utilização de organoalcoxissilanos sobre a síntese de sílicas híbridas pelo processo Sol-Gel dopadas com antocianinas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Instituto de Química. 2010.
- PODGORSKA, E. Effect of preservatives on patulin production by *Penicillium expansum*. **Acta Microbiologica Polonica**, Warszawa, v. 41, n. 1-2, p. 97- 107, 1992.
- PODBIELSKA, H., ULATOWSKA-JARZA, A. *Sol-gel* technology for biomedical engineering. **Bulletin of The Polish Academy of Science Technical Sciences**. v. 53, n. 3, 2005.
- POPOLIM, W. D. **Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada – Pronut FCF/FEA/FSP. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2004.
- POPOLIM, W. D. **Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares. Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Nutrição Humana Aplicada. 175p. 2009.
- POUZADA, A. S. (coord); CASTRO A. G, **Embalagens para a indústria alimentar**. Instituto Piaget, Ciência e Técnica, 2003. 610p.
- PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K. ; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of

chitosan films by incorporation garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 38, p. 859-865, 2005.

QI, H.; HU, W.; JIANG, A.; TIAN, M.; LI, Y. Extending shelf-life of fresh-cut `Fuji` apples with chitosan-coatings. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. n. 12, p 62-66, 2011.

QUEVEDO, R.; DÍAZ, O.; RONCEROS, B.; PEDRESCHI, F.; AGUILERA, J. M. Description of the kinetic enzymatic browning in banana (*Musa cavendish*) slices using non-uniform color information from digital images. **Food Research International**. Elsevier. v. 42 p. 1309-1314. 2009.

QUINTAVALLA, S., VICINI, L. Antimicrobial Food Packaging In Meat Industry. **Meat Science**, n. 62, p: 373-380, 2002.

RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Role, of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, v. 44 p. 185-194, 2007.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195 - 1236, 1998.

RÉ, M. I. Microencapsulação: tecnologia que atribui propriedades inteligentes a materiais ativos. **Ciência Hoje**, p. 24-29, 2000.

RESTUCCIA, D., SPIZZIRRI, U. G., PARISI, O. I. et al., New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry application. **Food Control**, v. 21, p. 1425-1435, 2010.

RICO, D.; MARTÍN-DIANA, A. B.; BARAT, J. M.; BARRY-RYAN, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. **Trends in Food Science & Technology**, n. 18, p. 373-386. 2007.

ROCHA, A. M. C. N., MORAIS, A. M. M. B. Shelf life of minimally processed apple determined by color changes. **Food Control**. v. 14, p 13-20, 2003.

ROJAS-GRAU, M. A.; OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 44 p. 875-889. 2009.

ROONEY, M. L. **Overview of active food packaging**. In: Active food packaging. London, Blakie Academic and Professional, p.1-37, 1995.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P. **Processos convencionais de conservação de água de coco**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. Cap. 6, p. 42-53., 2002.

ROUX, E.; BILLAUD, C.; MARASCHIN, C.; BRUN-MÉRIMÉE, S.; NICOLAS, J. Inhibitory effect of unheated and heated d-glucose, d-fructose and l-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. 2. Kinetic study and mechanism of inhibition. **Food Chemistry**, London, v.81, n.1, p.51-60, 2003.

SANTOS, D. A. A.; SOARES, N. F. F.; ENDO, E. UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA (UFV). **Filme antiescurecimento para emprego em vegetais**. BR Patente de Invenção - PI 07022735-4 A2. 20 jul 2007, 10 mar. 2009.

SANTOS, T. B. A, SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A. et al. Micro-organismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 13, n. 2, p. 141-146, abr/jun, 2010.

- SAPERS, G. M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. **Food Tec.**, v. 47, p. 75-84, 1993.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L., Embalagens para vegetais minimamente processados – fresh cut. Campinas: Cetea/Ital. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 9, n. 5, set-out, 1997.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L., FERNANDES, T. Embalagens ativas, uma nova geração para frutas e hortaliças. **Boletim Técnico do Centro Tecnológico de Embalagens**. v.13, n. 3, p. 4-6, 2001.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L., OLIVEIRA, L. M., PADULA, M., COLTRO, L., ALVES, R. M. V., GARCIA, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 267 p. 2002.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L., MORAES, B. B. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças. Campinas: Cetea/Ital. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v. 21, n. 1, jan-mar, 2009.
- SATAQUE, E. Y., WOSIACKI, G., Characterization of apple (*Malus domestica* var. Gala) polyphenol oxidase. **Arquives Biology and Technology**, v. 30, p. 287-299, 1987.
- SCANNELL, AG.M.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E.K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lactic in 3147 and Nisaplin. **International Journal of Food Microbiology**. v.60, p. 241–249. 2000.
- SEVERN, J.R.; CHADWICK, J. C.; DUCHATEAU, R. Bound but not gagged – Immobilizing single site – olefin polymerization catalyst. **Chemical Review**. v. 105 p. 4073-4147, 2005.
- SILVA, V.; SOARES, N. F. F.; GERALDINE, R. M. Efeito da embalagem em temperatura de estocagem na conservação de mandioca minimamente processada. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 6, n. 2, p 197-202, jul./dez. . 2003.
- SILVA, M. V.; ROSA, C. I. L. F.; VILAS BOAS, E. V. B. Conceitos e Métodos de Controle do Escurecimento Enzimático no Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. **Boletim Ceppa**. Curitiba. v. 27, n. 1. p: 83-96. jan/jun. 2009.
- SILVA, M. A. VIEIRA, M. G. A.; MAÇUMOTO, A. G.; BEPPU, M. M. Polyvinylchloride (PVC) and natural rubber films plasticized with a natural polymeric plasticizer obtained through polyesterification of Rice fatty acid **Polymer Testing**. v. 30, p 478–484, 2011.
- SILVEIRA, M. F. A., SOARES, N. F. F., GERALDINE, R. M., et al. Active film incorporated with sorbic acid in pastry dough conservation. **Food Control**. v. 18, p: 1063-1067, 2007.
- SIMÕES, A. N. **Alterações químicas e atividade de enzimas em folhas de couve inteiras e minimamente processadas**. Tese. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2004.
- SIMON, R. A. Adverse reactions to food and drug additives. **Imunology and Allergy clinics of North America**. v. 16, n. 1, p: 137-175, 1996.
- SOARES, N. de F. F.; PIRES, A. C. dos ; ENDO, E.; VILELA, M. A. P. SILVA, A. F. da.; FONTES, E. A. F.; MELO, N. R. de Desenvolvimento e avaliação de filme ativo na conservação de batata minimamente processada. **Revista Ceres**. v. 53 n. 307 p: 387-393. 2009.

SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; PIRES, A. C. S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p: 370-378, jul\ago, 2009b.

SOARES, N. F. F.; SA, S. C. A.; SANTIAGO-SILVA, P. et al. **Active and intelligent packaging for milk and milk products**. In: Engineering aspects of milk and dairy products. Coimbra, J. S. R., TEIXEIRA, J. A. (editores), Taylor & Francis Group, 2010.

SON, S. M., MOON, K. D., & LEE, C. Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, v.73, p. 23–30. 2001.

SOUZA, E. L. **Potencial Antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Oreganum vulgare* L.): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE, 2006.

SOUZA, M. A., PESSAN, L. A., RODOLFO JUNIOR, A. Nanocompositos de Poli(Cloreto de vinila) (PVC)/Argilas organofílicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 4, p 257-262, 2006b.

SUPPAKUL, P.; MILTZ J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Active Packaging. Antimicrobial Proprieties of Basil and its Possible application in food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51. p. 3197-3207. 2003.

SUPPAKUL, P.; MILTZ J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. **Journal of Food Science**. v. 68 n.2, p 408-420, 2003b.

SUPPAKUL, P.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W.; MILTZ J. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. **Journal of Food Engineering** v. 105 p. 270-276, 2011.

TAYLOR S. L. Why sulphite alternatives. **Food Technology**. Chicago, v. 47, n. 10, p. 14, 1993.

TEODORO, V. A. M. **Yersinia enterocolitica como perigo biológico em ambientes de abate de suínos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Pós Graduação em Medicina Veterinária. Viçosa, 2004.

THÉ, P. M. P.; BOTREL, N.; NUNES, R. P.; CARVALHO, V. D. Influência de Tratamentos Pós-colheita sobre a atividade enzimática de abacaxi CV. Smooth Cayenne. **Boletim Ceppa**. Curitiba. v. 24 n. 2 p: 423-442. jul/dez, 2006.

TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. **International of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 71-77, 2005.

TRESSELER, J. F. M.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W. Avaliação da Qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1722-1727, 2009.

TUKADA, S. M. **Desenvolvimento de um sistema e metodologia de medição da taxa de absorção de etileno por embalagens plásticas ativas**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química. Unicamp. Campinas, SP. 2002.

TURKYILMAZ, M.; TAGI, S.; OZKAN, M. Changes in chemical and microbial qualities of dried apricots containing sulphur dioxide at different levels during storage. **Journal Food and Bioprocess Technology**, may 2012.

ULLOA, J. A.; GUATEMALA, G. M.; ARRIOLA, E.; ESCALONA, H. B.; DÍAZ, L. Estimation of the diffusivities of sodium chloride, potassium sorbate and sodium bisulphite in

mango slice processed by hurdle technology. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 211-216. 2009.

USSEGLIO-TOMASSET, L. Properties and use of sulphur dioxide. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 399-404, 1992.

VANETTI, M. C. D. **Segurança microbiológica em produtos minimamente processados**. In: Encontro Nacional Sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Viçosa, MG. UFV, v. 3, p. 30-32. 2004.

VARSANT, E. F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K. C. Characterization and chemical modification of the silica surface. **Studies in surface science and catalysis** Elsevier, Amsterdam, n.93, 1995.

VERMEIREN, L., DEVLIEGHERE F., VAN BEEST Y M. DE KRUIJF, N., DEBEVERE, J. Developments In The Active Packaging Of Foods. **Food Science & Technology**. n. 10, p:77-86, 1999.

VIANNA, R. I., MAHLMANN, C. M., RODRIGUEZ, A. L. et al. **Estudo de embalagens flexíveis monocamada para acondicionamento de produtos liofilizados**. 17º. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência de Materiais, novembro de 2006.

VOGEL, J. B., M. **Análise química quantitativa**. 6ª edição. LTC, Grupo Gen. Rio de Janeiro, 2002.

WARNER, C. R.; et al. Sulfitos: an important food safety issue. **Food Testing & Analysis**, August;September, 2000. Disponível no site <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfit.html>, acessado em 07 de novembro de 2010. 2000.

WEDZICHA, B. L. Chemistry of sulphiting agents in food. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 449-459, 1992.

WEIDLER, P. G.; DEGOVICS, G.; LAGGNER, P. Surface roughness created by acidic dissolution of synthetic goethite monitored wtion isotith SAXS and N2-Adsorption Isotherms. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 197, 1-8. 1998.

WENG, Y.; HOTCHHISS, J. H. Anhydrides as antimicrobial agents added to polyethylene films for packaging. **Packaging technology and Science**. v. 6, p. 123 – 128, 1993.

WENG, Y-M. HOTCHKISS, J. H. **Packaging Technology and Science** v. 6, Publicação online: 28 Abril, p. 123 – 128, 2006.

WHITAKER, J. R.; LEE, C. Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In:(Ed.). **Enzymatic browning and its prevention**. Washington: American Chemical Society, p. 2-7, 1995

WONG, D. W. S.; GREGORSKI, K. S.; HUDSON, J. S.; PAVLATH, A. E. Calcium alginate films: thermal properties and permeability to sorbate and ascorbate. **Journal Food Science**, v. 61, n. 2, p 337-341. 1996.

WURLITZER, N. J. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan**. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, UFV. março de 2007.

XING, Y., YUN, J., LI, X., et al. The effect of formulation variables on the encapsulation efficiency and SO₂-release behavior of microparticles containing sulphite. **Advanced Materials Research**. v. 152, 153, p: 512-515, 2011.

YAM, K. L. TAKHISTOV, P. T., MILTZ, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. **Journal of Food Science** v. 70, n. 1, 2005.

YAMADA, E. **Desenvolvimento de sistema de embalagem antimicrobiana**. In: Boletim CTC Tecnocarnes, Vol XIV. Ital, Campinas – SP, 2004.

YAMASHITA, F., VEIGA, G. F., BENASSI, M. T., ROBERTO, S. R. Morangos embalados com filme de Poli (cloreto de vinila) (PVC). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p: 429-436, jul/set, 2006.

YAMASHITA, F.; NAKAGAWA, A.; VEIGA, G. F.; MALLI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Embalagem Ativa para Frutos de Acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 2, p: 95-100, abr-jun, 2006 b.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p: 420-430, abr-jun, 2009.

ZAGORY, D. Effects of post-processing handling and packaging on microbial population. **Postharvest Biology Technology**. v. 15, p. 313-321. 1999.

APÊNDICES