

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

*Marcella Vitoria Galindo
Isabela dos Santos Paglione
João Augusto Salviano de Medeiros
Fabio Yamashita
Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Lyssa Setsuko Sakanaka
Marianne Ayumi Shirai*

1 INTRODUÇÃO

Os grandes problemas enfrentados pela indústria de alimentos estão relacionados à forma de manejo durante o transporte e o armazenamento de mercadorias, a contaminação microbiana, o amadurecimento precoce de frutas e os resíduos sólidos gerados pelas embalagens de polímeros sintéticos (LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014). Uma das soluções para amenizar esses problemas é a produção de filmes biodegradáveis ativos, que vêm ganhando vasta importância, visando atender a necessidade do cliente que busca o armazenamento de alimentos com qualidade, elevada vida útil e menor impacto ambiental (SHO-GREN; BAGLEY, 1999).

Os filmes ativos biodegradáveis podem ser incorporados com óleos essenciais ou qualquer substância bioativa que interaja diretamente com os alimentos, conferindo-lhes aspectos sensoriais e nutricionais desejáveis (AZEREDO;

FARIA; AZEREDO, 2000). Filmes a base de proteínas e polissacarídeos com adição de óleos essenciais têm sido reportados como materiais com baixa permeabilidade ao oxigênio e luz (LIU; KERRY; KERRY, 2006; KANATT; CHANDER; SHARMA, 2008; TONGNUANCHAN et al., 2015).

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

Uma solução para amenizar as propriedades hidrofílicas da gelatina é a realização de blendas com outros polímeros, como a quitosana, que é obtida a partir da desacetilação da quitina, que é um polissacarídeo natural abundante na natureza com vasta aplicação na produção de filmes biodegradáveis. É encontrada em carapaças de crustáceos (caranguejo, lagosta e camarões) e insetos, podendo ser produzida também por fungos (ABDOU; NAGY; ELSABEE, 2008; ELSABEE; ABDOU, 2013). Adicionalmente, possui grande potencial para ser utilizada na produção de embalagens alimentícias e como veículo para liberação controlada de aditivos, uma vez que pesquisas indicam que apresentam boas propriedades antimicrobianas frente aos microrganismos deteriorantes de alimentos (LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014; RAVI KUMAR, 2000).

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

Neste contexto, esta pesquisa foi dividida em duas etapas. A primeira consistiu na produção de filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais e na caracterização quanto às propriedades mecânicas, propriedades de barreira ao vapor de água, umidade, solubilidade, atividade antimicrobiana

e antioxidante. Na segunda etapa, os filmes foram aplicados na conservação de presunto embalados a vácuo, e análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas durante o armazenamento refrigerado.

2 FILMES BIODEGRADÁVEIS

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

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

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

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

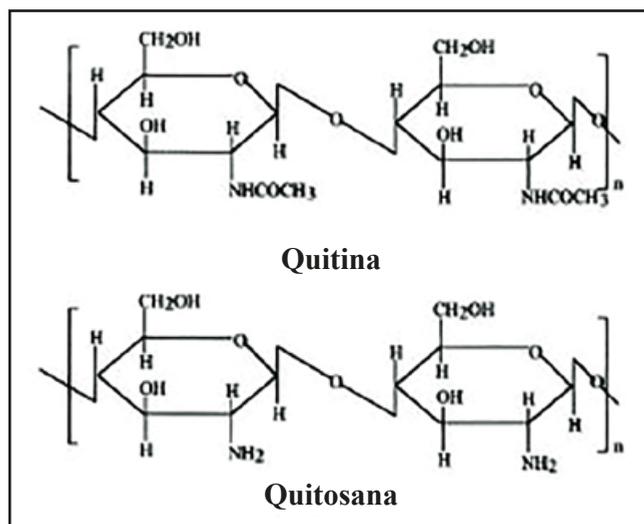
Filmes à base de proteínas (gelatina e colágeno, zeína, glúten) e/ou polissacarídeos (celulose, quitosana, gomas) possuem caráter hidrofílico e estão suscetíveis a variação de suas propriedades funcionais quando expostos a ambientes com alta umidade relativa (SHIH, 1996). Para amenizar este problema, pode-se

adicionar substâncias que confirmam caráter hidrofóbico, como os lipídeos, ou realizar blends com outros polímeros.

2.2 QUITOSANA

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

Figura 1 - Estrutura química da quitina e quitosana



Fonte: Ravi-Kumar, 2000.

A quitosana tem sido reportada como um polímero não-tóxico, biodegradável, biocompatível, com propriedades funcionais, potencial antimicrobiano e antioxidante, sendo muito utilizada na indústria de alimentos, na área biomédica, farmacêutica, e para liberação controlada de fármacos e substâncias bioativas. Em função da sua estrutura química, a quitosana se torna uma excelente alternativa para ser utilizada como base na produção de nanopartículas, micropartí-

culas, hidrogéis, embalagens e filmes biodegradáveis (RAVI KUMAR, 2000; YUAN; CHEN; LI, 2016).

As embalagens de alimentos possuem como matriz polímeros provenientes de petróleo, e a quitosana, por ser biodegradável, torna-se uma alternativa para a diminuição dos impactos ambientais gerados pelos resíduos sólidos e possui atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos e deteriorantes, uma vez que, devido às suas cargas positivas, ela interage com as cargas aniônicas da membrana celular dos microrganismos, impedindo que os mesmos se desenvolvam. Com isso, pode-se obter elevação da vida útil dos alimentos, manutenção das suas características sensoriais e nutricionais e redução de desperdícios (DUTTA et al., 2009).

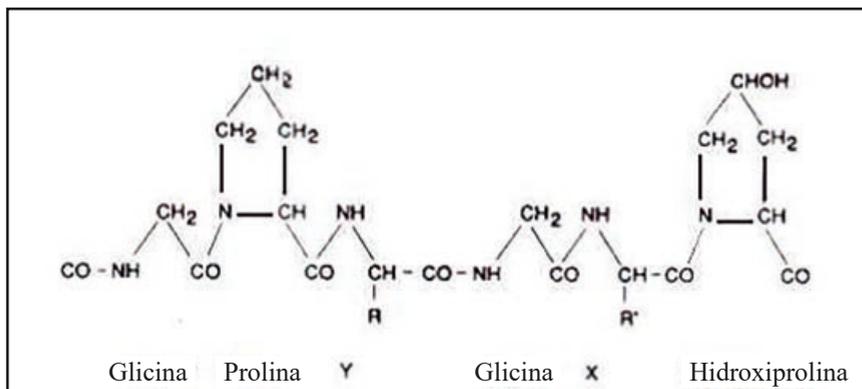
Alguns estudos utilizaram blendas de quitosana e gelatina para produção de filmes e obtiveram bons resultados de barreira ao oxigênio, água e luz. A junção dos dois biopolímeros está sendo muito utilizada para produção de embalagens alimentícias por serem biodegradáveis e amplamente encontrados na natureza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

2.3 GELATINA

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

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

Figura 2 - Estrutura química da gelatina



Fonte: POPPE, 1987 apud BERTAN, 2003.

A gelatina é uma proteína muito utilizada para formação de filmes comestíveis e como agente encapsulante de substâncias bioativas, e alguns autores utilizaram gelatina afirmando ser uma boa matriz contra gases (O_2 e CO_2) (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

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

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

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

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

São extraídos de diversas plantas em diferentes lugares (flor, semente, raiz), por diversas técnicas como, por exemplo, extração por solventes e destilação a vapor, sendo esta última a mais utilizada em escala de produção comercial, por apresentar 93% de rendimento de extração, e por ser mais barata

quando comparada a métodos mais avançados, como extração com fluidos supercríticos (MASANGO, 2005) e ser uma técnica relativamente simples que não utiliza solventes tóxicos como éter e hexano. A destilação por arraste de vapor fundamenta-se pelo arraste de água em um sistema fechado, onde este vapor quando em contato com a amostra, ocasiona a quebra da estrutura celular da planta e libera os compostos aromáticos (óleos essenciais) (PERINEAU; GANOU; VILAREM, 1992).

Alguns óleos essenciais possuem naturalmente atividade antioxidante e/ou antimicrobiana, que dependem das propriedades químicas da planta, fonte de onde o óleo foi extraído, e método ou solvente utilizado na extração. Os principais componentes responsáveis por essas características são terpenos, terpenos oxigenados, aldeídos, cetonas, álcoois e fenois (BAKKALI et al., 2008). Entretanto, os óleos essenciais são constituídos de diferentes componentes, fazendo com que não seja apenas uma substância, mas sim a junção de vários compostos para a eficácia da atividade contra microrganismos (BURT, 2004).

Dentre os componentes químicos encontrados nos óleos essenciais, o carvacrol sobressai como um grande elemento relacionado à ação antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, interagindo com componentes da membrana celular do microrganismo, desequilibrando a permeabilidade de íons essenciais para o seu desenvolvimento (BURT, 2004; VELDHUIZEN et al., 2006). Para a ação antioxidante, são descritos como componentes majoritários: timol (BOZIN et al., 2006) e eugenol (WEI; SHIBAMOTO, 2010). Óleos essenciais podem ser utilizados como antioxidantes naturais, prevenindo a oxidação lipídica nos alimentos (DAPKEVICIUS et al., 1998). Pode ser utilizado também como componente ativo para aplicação em embalagens de alimentos, aumentando significativamente a barreira ao vapor de água devido à sua característica hidrofóbica (COMA, 2008).

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

O alecrim (*Rosmarinus officinales* Laminaceous) é uma planta que cresce na forma de arbustos selvagem nos países do entorno do mar mediterrâneo e é amplamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, pois apresenta em sua composição química substâncias com princípios ativos

antioxidante e antimicrobiano, que se devem principalmente aos compostos fenólicos (FLAMINI et al., 2002).

Alguns autores utilizaram o óleo essencial de alecrim em filmes biodegradáveis e obtiveram resultados positivos contra o crescimento de microrganismos no alimento (MELO, 2010; YUAN; CHEN; LI, 2016), devido aos seus constituintes (α -pineno, acetato de bornil, cânfora, 1-8-cineol, limoneno, borneol e verbenona), que compõe 80 % do total de componentes do óleo (BURT, 2004; OKOH; SADIMENKO; AFOLAYAN, 2010; KADRI et al., 2011). Em estudos relacionados, Silveira et al. (2012) verificaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* ao utilizar óleo essencial de alecrim puro por meio da técnica de difusão em disco.

O óleo de orégano (*Origanum vulgare*) é muito utilizado para a produção de filmes biodegradáveis para a conservação de alimentos, devido aos seus componentes carvacrol e timol (BOUNATIROU et al., 2007). Hosseini et al. (2015) incorporaram óleo de orégano (0,4 a 1,2%, m/v) em filmes de gelatina e quitosana e verificaram redução na resistência à tração dos filmes, e os mesmos apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

A utilização de óleos essenciais em alimentos deve ser cautelosa, pelo fato de que o excesso de compostos aromáticos no alimento acarretará características sensoriais indesejáveis. Dessa forma, pelas propriedades antimicrobiana e antioxidante que os óleos essenciais apresentam, seu uso é de grande interesse na produção de filmes ativos biodegradáveis, visando a uma melhoria na qualidade sensorial, nutricional e microbiológica dos alimentos (ARFA et al., 2007; SEYDIM; SARIKUS, 2006; ROMANI; PRENTICE-HERNANDEZ; MARTINS, 2016).

2.5 PRESUNTO

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

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

A oxidação lipídica divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação. A iniciação está relacionada com a presença de metais de transição, como o ferro, presente em produtos cárneos, que atuam como catalisadores, capazes de interagir com o oxigênio que reage com a molécula de ácido graxo insaturado, retirando o átomo de hidrogênio do carbono que se encontra ao lado da ligação dupla *cis* (KANNER, 1994). Na reação de propagação, ocorre a formação de peróxidos que podem ser quantificados nas análises de oxidação lipídica em alimentos (GRAY, 1978), e, na fase de terminação, ocorre a polimerização dos peróxidos, com a formação de produtos finais da oxidação, como aldeídos, hidrocarbonetos, álcoois e ácidos que estão associados no desenvolvimento de odores e sabores negativos, afetando diretamente na qualidade dos produtos cárneos (KUBOW, 1992).

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

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

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de uma pesquisa acadêmica, de carácter experimental. Todo o experimento foi realizado nos laboratórios do curso de Tecnologia de alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Londrina, no período de março a novembro de 2017.

3.1 MATERIAL

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

Para a realização das análises microbiológicas, utilizaram-se os seguintes materiais: Ágar Müeller Hinton (Himedia, Índia), caldo Müeller Hinton (Himedia, Índia), Ágar MRS (Himedia, Índia), Ágar Para Contagem (Himedia, Índia) e Peptona Bacteriológica (Himedia, Índia).

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

3.2 PRODUÇÃO DOS FILMES

Os filmes foram preparados pela técnica de *casting*, a partir da metodologia empregada por Bonilla e Sobral (2016) com algumas modificações. Inicialmente prepararam-se as soluções de gelatina e quitosana separadamente. A quitosana (Q) 2% (m/v) foi dissolvida em ácido acético 1% (v/v) e mantida sob agitação magnética com aquecimento a 45 °C por 1 hora. A solução de gelatina (GEL) 4% (p/v) com adição de glicerol (1 g/100 ml de solução de gelatina) foi dissolvida sob agitação magnética e aquecimento a 55 °C por 35 min. Posteriormente, foi feita a mistura das duas soluções, na proporção de 1:1, com incorporação de 2% de óleo essencial (p/v) e 1% de Tween 80 (p/v). A concentração de óleo essencial a ser adicionada nos filmes foi definida por testes preliminares, considerando a presença de atividade antimicrobiana dos mesmos. Finalmente as soluções foram homogeneizadas em Ultra-turrax (marca IKA, modelo T18, EUA) a 10.000 rpm por 4 min., vertidos em placas de acrílico e secos em incubadora BOD (Tecnal, Brasil) *over night* a 25 °C. Os filmes produzidos consistiram em: controle (FC), sem adição de óleo, filme com óleo essencial de orégano (FO) e filme com óleo essencial de alecrim (FA).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

A seguir estão descritas as técnicas de caracterização dos filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleos essenciais produzidos neste trabalho.

3.3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

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

3.3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos filmes foi realizada pela técnica de difusão de disco, de acordo com a metodologia desenvolvida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003), onde os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) e *Escherichia coli* (ATCC 35218). Inicialmente as bactérias foram reativadas em tubos contendo caldo Müeller Hinton e incubadas a 35 °C por 24 horas. Após esse processo, retirou-se 0,1 ml do caldo e transferiu-se para um tubo contendo água peptonada 0,1% (p/v), e foi comparada a turbidez do tubo com o padrão 0,5 da escala McFarland, que corresponde a 10^8 UFC/ ml. Placas de Petri contendo Ágar Müeller Hinton foram adicionadas de 0,1 ml de suspensão bacteriana e foi feita a semeadura com alça de Drigalsky. Em seguida, os filmes com diâmetro de 1,5 cm foram dispostos no meio das placas. Finalmente, as placas foram incubadas a 35 °C por 24-48 horas, e observou-se a formação de halo de inibição.

3.3.3 TESTE DE TRAÇÃO

Os testes de tração foram feitos em texturômetro da marca Stable Micro Systems, modelo TA XTplus (Inglaterra), conforme a norma D-882-00 da Ame-

ican Society for Testing and Material (ASTM, 2001). Para cada formulação foram cortados dez corpos de prova nas dimensões de 1 x 8 cm, foi medida a sua espessura, e foram condicionados em dessecador contendo solução saturada de nitrato de magnésio (Umidade Relativa (UR) de 53%) a 25 °C, pelo período de 48 horas. As condições do ensaio foram: distância inicial entre as garras de 30 mm e velocidade de tração de 0,8 mm/s.

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

(1)

$$R_{m\acute{a}x} = \frac{F_{m\acute{a}x}}{A_{m\acute{i}n}} = \frac{F_{m\acute{a}x}}{L \cdot e_{m\acute{i}n}}$$

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

(2)

$$E = \frac{E_{rup}}{D_{garras}} \cdot 100$$

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

(3)

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

MY = Módulo de Young (MPa)

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

e = Espessura do corpo de prova (m)

L = Largura inicial do corpo de prova (m)

DG = Distância entre as garras (m)

A_x = Alongamento registrado no ponto x (m)

3.3.4 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA

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

(4)

$$TPVA = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A}$$

(5)

$$PVA = \frac{(TPVA \times e)}{p_s \times (UR_1 - UR_2)} \times 100$$

PVA= Permeabilidade ao vapor e água (g.h⁻¹. m⁻¹. Pa⁻¹)

e= Espessura média do corpo de prova (m)

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

UR₁= Umidade relativa dentro do dessecador (%)

UR₂= Umidade relativa dentro da cápsula (%)

TPVA= Taxa de permeabilidade ao vapor de água (g. h⁻¹. m⁻²)

m= Ganho de massa de água (g)

t= tempo (h)

A= Área de permeação do corpo de prova (m²)

3.3.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Para a realização da análise de solubilidade em água, foi utilizada a metodologia empregada por Gontard, Guilbert e Cuq (1992) com algumas modificações. Filmes de 4 cm² foram adicionados em erlenmeyers contendo 200 ml de água destilada e seguiram para agitação em incubadora shaker (Nova Técnica, Brasil) a 140 rpm por 24 horas e a 25 °C. Em seguida, os filmes foram secos em estufa a 105 °C por 24 horas para determinar a massa seca final. A solubilidade em água dos filmes foi calculada com a Equação 6.

(6)

$$\text{SOL} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

m_i = massa inicial (g)

m_f = massa final (g)

SOL = Solubilidade do filme (%)

3.3.6 UMIDADE DOS FILMES

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

(7)

$$U = \frac{(m_i - m_s)}{m_i \times 100}$$

m_i = massa inicial (g)

m_s = massa seca final da amostra (g)

U = umidade (%)

3.4 APLICAÇÃO DOS FILMES EM PRESUNTO EMBALADO A VÁCUO

Os filmes foram aplicados em fatias unitárias de presunto, adquiridas no comércio da cidade de Londrina – PR. O presunto foi cortado no tamanho de 8 cm x 14,5 cm e 1 cm de espessura. Cada face do presunto foi recoberta com uma formulação de filme (FC, FO ou FA), acondicionada em sacos plásticos e selada a vácuo com uma seladora (Selovac, Brasil). O presunto sem recobrimento com filme também foi embalado a vácuo como controle. Finalmente as amostras foram armazenadas em estufa incubadora (BOD) a 8 °C pelo período de 35 dias.

3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

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

3.5.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E AERÓBIOS MESÓFILOS

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

3.5.2 MEDIDA DE COR

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

3.5.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA DO PRESUNTO

Para a realização da oxidação lipídica, empregou-se a metodologia de quantificação de substâncias capazes de reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), descrita por Bruna et al. (2001). Foi feita a extração dos aldeídos utilizando um homogeneizador Ultra-turrax, a 10.000 rpm por 3 minutos, de uma solução contendo 5 g de presunto e 25 ml de uma solução de ácido tricloroacético 7,5% (p/v) e 0,1 % de BHT. Em seguida, a solução foi filtrada em papel filtro e uma alíquota de 5 ml do filtrado foi colocada em tubo de ensaio, logo após, foi adicionado 5 ml de solução de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,02 mol/L, e aquecido em banho-maria (100 °C) por 40 minutos para a formação do complexo colorido. Posteriormente, essa solução seguiu para a medida da absorbância em espectrofotômetro UV/visível com comprimento de onda de 538 nm. Para a quantificação do complexo colorido, foi elaborada uma curva padrão de 1,1,2,2 tetrametoxipropano (Sigma Aldrich, EUA), nas concentrações de 1,5 a $6,0 \times 10^{-8}$ ($y=1 \times 10^7 x + 0,055$; $R^2=0,9943$). O resultado da oxidação lipídica foi expresso em mg de malonaldeído/kg de amostra de presunto.

3.5.5 MEDIDA DE PH

As medidas de pH foram realizadas em triplicata, por meio de um pHmetro (Hanna Instruments, EUA) com eletrodo de vidro combinado, em que se utilizou 3 g de presunto em 30 ml de água deionizada.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

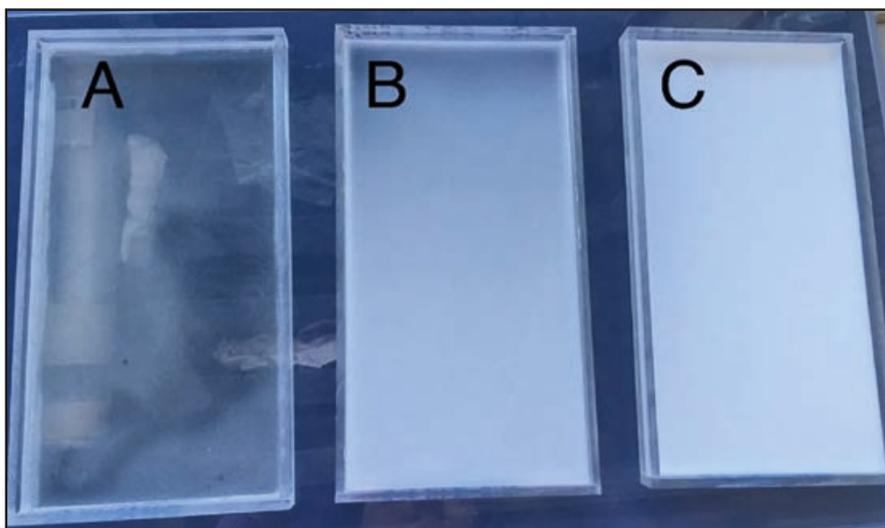
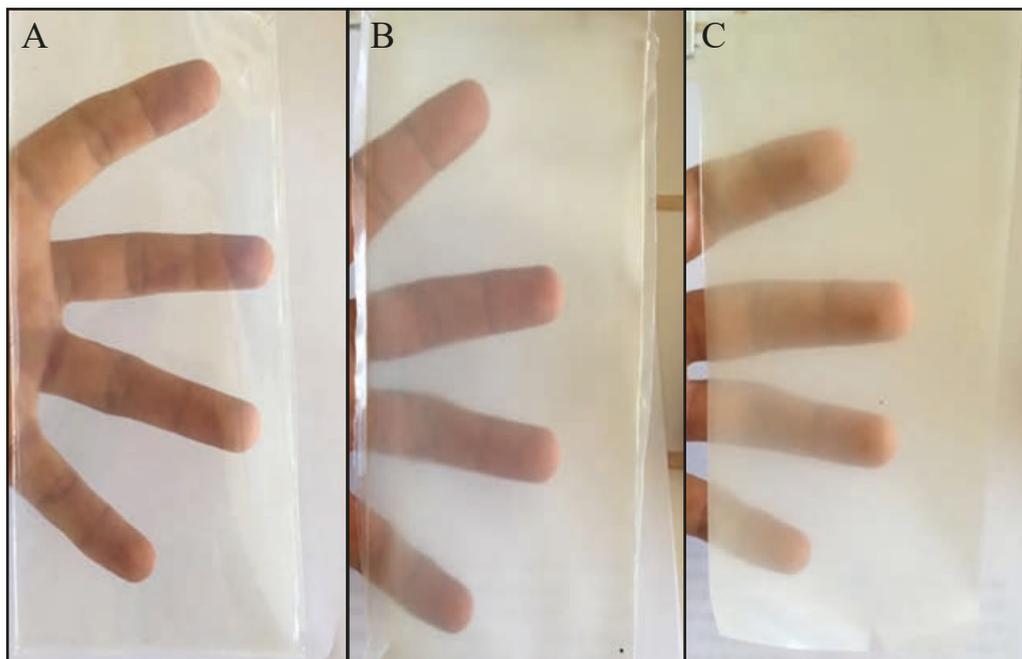


Figura 4 – Filmes de gelatina e quitosana secos: A (FC); B (FA); C (FO)

Fonte: Autoria Própria, 2017.

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

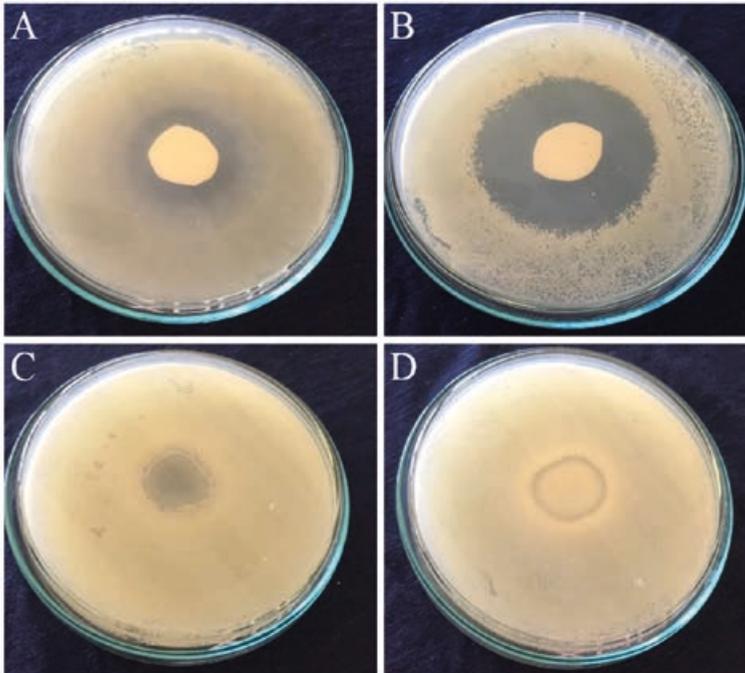
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE

Em relação à atividade antimicrobiana dos filmes, o filme contendo orégano (FO) apresentou maior halo de inibição contra *S. aureus* e *E. coli*, obtendo di-

âmetro médio de 3 cm e 4,7 cm, respectivamente, em comparação com o filme incorporado com alecrim (FA), que apresentou halo de inibição de 2 cm contra *E. coli* e 1,8 cm contra *S. aureus*, e comparando-se com o filme sem óleo essencial (FC), que não apresentou efeito bactericida frente aos microrganismos em estudo (Figura 5). Comportamento similar foi relatado por Seydrim e Sarikus (2006), que constataram que óleo de orégano na concentração de 2% em filmes de proteína do soro do leite apresentou maior poder antibacteriano contra *S. aureus*, *L. monocitogenes*, *E. coli* e *Lactobacillus plantarum*, em comparação com os filmes contendo óleo de alecrim.

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

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



Fonte: Autoria Própria, 2017.

Bonilla e Sobral (2016) obtiveram resultados contra *S. aureus* e *E. coli* significativos utilizando filmes de quitosana e gelatina incorporados com óleo de

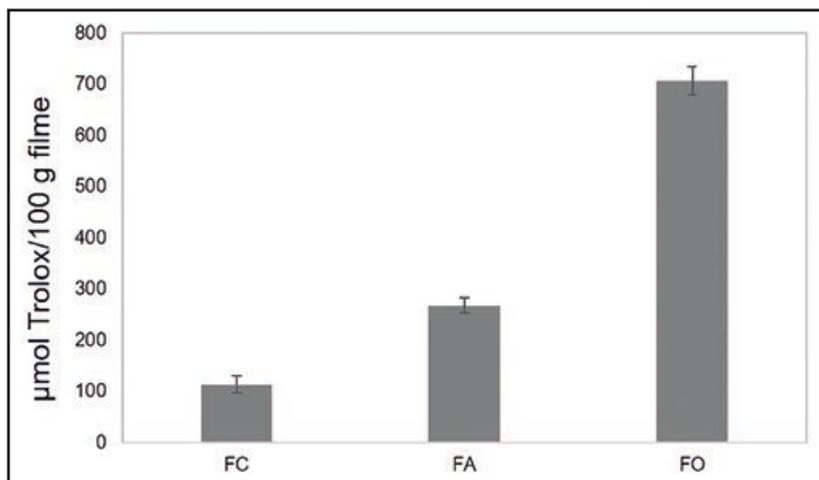
alecrim, sendo que os halos de inibição variaram de 23 a 26 mm. Gómez-Estaca et al. (2010) relataram que filmes à base de gelatina de pele de peixe com adição de óleo essencial de orégano apresentaram ampla capacidade inibitória contra diferentes microrganismos deteriorantes de alimentos, indicando que sua utilização se torna promissora, visando a um aumento de vida útil de alimentos.

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

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

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

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



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

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

4.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Adequadas propriedades mecânicas e de barreiras são requeridas em uma embalagem com a função de proteger a integridade do alimento e garantir uma maior vida útil do mesmo. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de propriedades mecânicas, em termos de resistência máxima a tração (T), alongação na ruptura (E) e módulo de Young (MY).

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

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

Letras iguais na coluna não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria Própria, 2017.

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

A partir dos dados obtidos, observa-se que a adição de óleo essencial de orégano causou uma redução média de 62,5% na resistência à tração e de 45,5%

no módulo de Young. Isso pode ser atribuído ao efeito plastificante do óleo de orégano, que causou uma redução na interação polímero-polímero, conduzindo à descontinuidade da matriz do filme. A redução da continuidade e a falta de coesão da estrutura do filme diminuí, desta forma, a resistência à tração (TONGNUAN-CHAN et al., 2015). Para a elongação na ruptura não foi verificada diferença significativa entre as amostras. Comportamento similar foi reportado por Hosseini et al. (2015) em filmes compósitos de gelatina e quitosana, adicionados de diferentes concentrações de óleo de orégano (0,4 a 1,2%), e por Pelissari et al. (2009), em filmes de amido de mandioca e quitosana a adicionados de óleo de orégano.

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

Chen et al. (2016) incorporaram diversas concentrações de nanoemulsão de óleo de canela em filmes de quitosana e observaram que os valores de módulo de Young e tração decaíram em comparação com o filme de quitosana sem adição de óleo. Benavides et al. (2012) produziram filmes de alginato com adição de óleo essencial de orégano em concentrações que variaram de 0,5 a 1,5%. Os autores verificaram que os valores de elongação na ruptura elevavam-se à medida que aumentava-se a concentração de óleo (2,2 a 3,7%), e no teste de tração, os valores decaíram conforme adicionou-se o óleo essencial, variando de 71,0 MPa do filme controle a 31,1 MPa, com 1,5% de óleo.

4.3 PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA, UMIDADE E SOLUBILIDADE

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

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

Formulação	PVA x 10⁷(g/h.m.Pa)	Solubilidade (%)	Umidade (%)
FC	2,17±0,25 ^b	66,50 ± 3,76 ^a	5,07±2,43 ^a
FO	3,25±0,12 ^a	53,37 ± 3,91 ^b	5,22±1,02 ^a
FA	2,45±0,22 ^{a,b}	68,01 ± 1,31 ^a	5,09±2,34 ^a

Letras iguais na coluna não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria Própria, 2017.

Para PVA, o filme FO se sobressaiu, apresentando maior valor em relação às demais formulações. Fato discrepante do reportado por Gallo et al. (2000), que enfatizam que a adição de substâncias hidrofóbicas como óleos essenciais diminui a interação da matriz do filme com moléculas de água, conferindo um caráter mais hidrofóbico.

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

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

A solubilidade em água dos filmes variou de 53,37 a 68,01%, e valores próximos foram encontrados por Hosseini et al. (2015) em filmes de gelatina e quitosana adicionados de óleo de orégano. O filme FO apresentou solubilidade significativamente menor que as demais amostras, não corroborando os resultados de PVA. Comportamento similar foi observado por Oliveira et al. (2017) em filmes de proteína do soro de leite incorporados de óleo de orégano, e os autores atribuem este fato ao caráter hidrofóbico do óleo.

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

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

Os presuntos embalados a vácuo contendo filmes de quitosana e gelatina com e sem adição de óleos essenciais foram submetidos ao armazenamento refrigerado durante 35 dias. A partir da Figura 7, nota-se a aparência das fatias de

presunto no momento em que foram embalados em sacos plásticos e selados a vácuo. O filme FO, logo ao ser embalado com o presunto apresentou coloração esbranquiçada e os filmes FC e FA incharam ao entrar em contato com o presunto, possivelmente devido à migração de água do presunto para o filme.

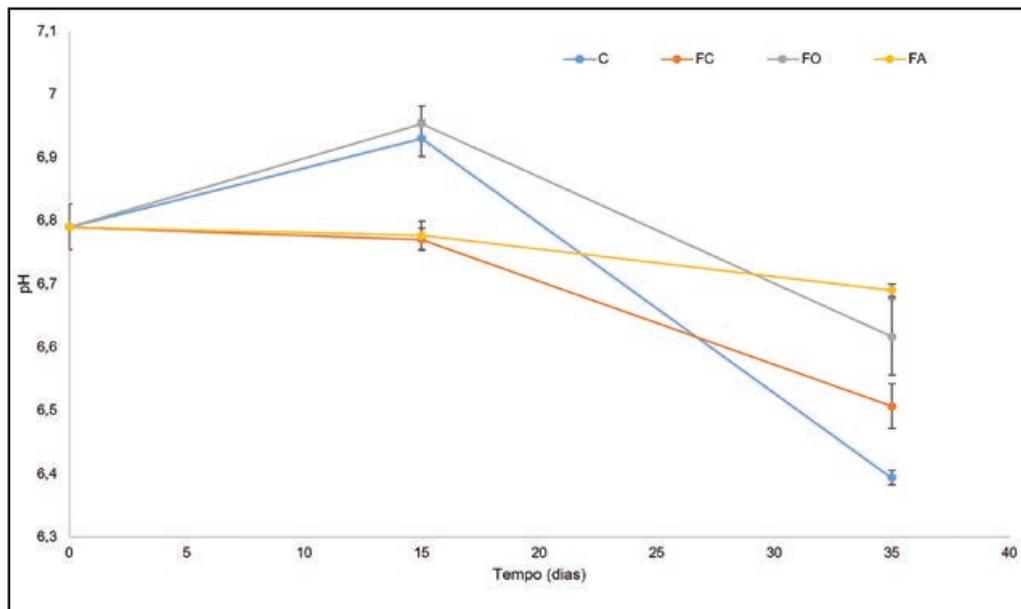
Figura 7- Presunto recoberto com os filmes FC, FO e FA e embalado a vácuo



Fonte: Autoria Própria, 2017.

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

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



Fonte: Autoria Própria, 2017.

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

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

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

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

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

Letras minúsculas na linha e letras maiúscula na coluna iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Aatoria Própria, 2017.

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

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

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

Torres e Okani (1997) evidenciam que valores de TBARS até 1,59 mg de malonaldeído/kg de produto são incapazes de causar alterações sensoriais perceptíveis e de saúde ao consumidor, deixando evidente que o presente trabalho se encontra dentro dos limites descritos anteriormente. Já Greene e Cumuze (1982) estabelecem que 2 mg de malonaldeído/kg é aceitável em produtos cárneos.

Os parâmetros de cor, expressos em termos de L^* , a^* e b^* , estão descritos na Tabela 4. Foi possível observar que durante os 15 dias de armazenamento não houve diferença significativa entre as amostras para todos os parâmetros avaliados. Após 35 dias, para o parâmetro L^* (luminosidade), o FC se mostrou

menor, enquanto que os outros tratamentos aumentaram os valores, indicando que os presuntos estavam com coloração mais clara.

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

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

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

Letras iguais na coluna não diferem entre si ($p_0 > 0,5$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoria Própria, 2017.

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

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

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

Fonte: Autoria Própria, 2017.

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

De acordo Slongo (2008), as bactérias ácido-lácticas são microrganismos deteriorantes de produtos cárneos cozidos refrigerados à vácuo, que causam características indesejáveis a esses produtos. No presente trabalho, a contagem de bactérias lácticas foi baixa e com evolução lenta, comparada com Geitenes et al. (2013), que obtiveram crescimento de aproximadamente 7 log UFC/g de bactérias lácticas em presunto embalado a vácuo e armazenado por 45 dias.

Rodrigues (2015) utilizou embalagens biodegradáveis a base de amido e poli (ácido láctico) contendo nanopartículas de prata em presunto fatiado e verificou redução na contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos durante 10 dias de armazenamento refrigerado.

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

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

5 CONCLUSÃO

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

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

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A Novel Active Bionanocomposite Film Incorporating Rosemary Essential Oil and Nanoclay Into Chitosan. *Journal of Food Engineering*, v. 111, p. 343-350, 2012.

ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Local Sources. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1359-1367, 2008.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis: 930.04. Moisture Content in Plants*, v. 1, n. 40, 1990.

ARFA, A. B.; CHRAKABANDHU, Y.; PREZIOSI-BELLOY, L.; CHALIER, P.; GONTARD, N. Coating Papers with Soy Protein Isolates As Inclusion Matrix of Carvacrol. *Food Research International*, v. 40, n. 1, p. 22-32, 2007.

ASTM. American Society for Testing and Materials. *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. ASTM E96-00*, Philadelphia, 8, 2000.

ASTM. American Society for Testing and Materials. *Standard Test Method for Tensile Properties Of Thin Plastic Sheeting. D882-00*, Philadelphia, 08.01, 9, 2001.

AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. D. A. F.; AZEREDO, A. M. C. Embalagens ativas para alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 3, p. 337-341, 2000.

BAKKALI, F. et al. Biological Effects of Essential Oil - A Review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, Mechanical and Antibacterial Properties of Alginate Film: Effect of the Cross-linking Degree And Oregano Essential Oil Concentration. *Journal of Food Engineering*, v. 110, p. 232-239, 2012.

BERTAN, L. C. *Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco*. 149f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BIGI, A.; BRACCI, B.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N. Drawn Gelatin Films with Improved Mechanical Properties. *Biomaterials*, v. 19, n. 24, p. 2335-2340, 1998.

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

BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Investigation of the Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of gelatin-Chitosan Adible Film Mixed with Plant Ethanolic Extracts. *Food Bioscience*, v. 16, p. 17-25, 2016.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M. L.; BLIXT, Y. Bacterial Spoilage of Meat and Cured Meat Products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 103-120, 1996.

BOUNATIROU, S.; SMITI, S.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, L.; REJEB, M. N.; NEFFATI, M.; COSTA, M. M.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.;

PEDRO, L. G. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils Isolated from *Tunisian Thymus Capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*, v. 105, p. 146-155, 2007.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the Volatile Composition of Essential Oil of Some Laminaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. *Regulamento técnico de identidade e qualidade de presunto*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000.

BRESSAN, M. C.; LODI, F.; FERREIRA, M. W.; ANDRADE, P. L.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Influência da embalagem na vida útil de presuntos fatiados. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 2, p. 433-438, 2007.

BRUNA, J. M.; ORDÓÑEZ, J. A.; FERNÁNDEZ, M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. de la. Microbial and Physico-Chemical Changes Turing the Ripening of Dry Fermented Sausages superficially Inoculated with or Having Added an Intracellular Cell-Free Extract of *Penicillium aurantiogriseum*. *Meat Science*, v. 59, p. 87-96, 2001.

BURT, S. Essential oils: Their Antimicrobial Properties and Potential Applications in Food – a Review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.

CHEN, H.; HU, X.; CHEN, E.; WU, S.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, S.; LI, B.; LI, Y. Preparation, Characterization, and Properties of Chitosan Films with Cinnamaldehyde Nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 662-671, 2016.

CHIOU, B. S. et al. Cold water Fish Gelatin Films: Effects of Cross-linking on Thermal, Mechanical, Barrier, and Biodegradable Properties. *European Polymer Journal*, v. 44, p. 3748-3753, 2008.

COMA, V. Bioactive Packaging Technologies for Extend Shelf Life of Meat-Based Products. *Meat Science*, v. 78, n. 1-2, p. 90-103, 2008.

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

CORNFORTH, D. Colour Meat – Its Basis And Importance. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish product*. Black Academic & Professional, 1994. chap. 2, p. 34-78. (Advances in Meat Research Series, v. 9).

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible Packaging Films Based on Fish Myofibrillar Proteins: Formulation and Functional Properties. *Journal of Food Science*, v. 60, n. 6, p. 1369-1374, 1995.

DAPKEVICIUS, A.; VENSKUTONIS, R.; VAN BEEK, T. A. LINSSEN, J. P. H. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 77, n. 1, p. 140-146, 1998.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Applications. *Food Chemistry*, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

EBURNE, R. C.; PRENTICE, G. Modified Atmosphere Packed Ready to Cook and Ready to Eat Meat Products. In: MAN, C. M. D.; JONES, A. A. *Shelf life evaluation of foods*. Boston: Springer, 1996. p. 156-178.

ELSABEE, M. Z.; ABDOU, E. S. Chitosan Based Edible Films and Coatings: A Review. *Material Science and Engineering*, v. 33, p. 1819-1841, 2013.

FERNANDES, R. P. F. B. *A valiação do potencial de revestimentos de origem proteica incorporados com extratos e/ou óleos essenciais de plantas aromáticas na preservação de produtos cárneos*. 130 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I.; MACCHIA, M.; CECCARINI, L.; Main Agronomic Productive Characteristics of two Ecotypes of *Rosmarinus Officinalis* L. and Chemical Composition of their Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 3512-3517, 2002.

FRANKEL, E. N. Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance. *Agricultural Research Service*, v. 61, n. 12, 1984.

GALLO, J. A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid Hydrophobicity, Physical State and Distribution Effects on the Properties of Emulsion-based Films. *Journal of Membrane Science*, v. 180, n. 1, p. 37-46, 2000.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido fatiados e embalados a vácuo. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 15, n. 1, p. 113-133, 2013.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L. Moisture Adsorption by Grain Protein Films. *Transactions of ASAE*, v. 37, n. 2, p. 535-539, 1994.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Biodegradable Gelatin-chitosan Films Incorporated with Essential Oils As Antimicrobial Agents for Fish Preservation. *Food Hydrocolloids*, v. 27, n. 7, p. 889-896, 2010.

_____.; MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; ALEMÁN, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Physical and Chemical Properties of Tuna-skin and Bovine-hide Gelatin Films with Added Aqueous Oregano And Rosemary Extracts. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 5, p. 1334-1341, 2009.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: Technology and Properties of Edible and/or Biodegradable Material of Agricultural Origin. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 3-15. 1996.

_____.; CUQ, J. L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, v. 57, n. 1, 1992.

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

GREENE, B. E.; CUMUZE, T. H. Relationship Between TBA Numbers and Inexperienced Panelists Assessments of Oxidized Flavor in Cooked Beef. *Journal of Food Science*, v. 47, n. 1, p. 52-54, 1982.

HAFSA, J.; SMACH, M.; KHEDHER, M. R. B.; CHARFEDDINE, B.; LIMEN, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Chitosan Films Containing Eucalyptus Globulus Essential Oil. *LWT- Food Science and Technology*, v. 68, p. 356-364, 2016.

HOLLEY, R. A. Impact of Slicing Hygiene Upon Shelf Life and Distribution of Spoilage Bacteria in Vacuum Packaged Cured Meats. *Food Microbiology*, v. 14, p. 201-211, 1997.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Bio-based Composite Edible Films Containing Origanum Vulgare L. Essential Oil. *Industrial Crops and Products*, v. 67, p. 403-413, 2015.

_____.; GHAVI, F. F. Preparation and Functional Properties of Fish Gelatin-Chitosan Blend Edible Films. *Food Chemistry*, v. 136, n. 3-4, p. 1490-1495, 2013.

JRIDI, M.; HAJJI, S.; AYED, H. B.; LASSOUED, I.; MBAREK, A.; KAMMOUN, M.; SOUISSI, N.; NASRI, M. Physical, Structural, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Gelatin-Chitosan Composite Edible Films. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 67, p. 373-379, 2014.

KADRI, A.; ZARAI, Z.; CHOBBA, I. B.; BÉKIR, A.; GHARSALLAH, N.; DAMAK, M.; GDOURA, R. Chemical Constituents and Antioxidant Properties

Of *Rosmarinus Officinalis* L. Essential Oil Cultivated from the South-Western of Tunisia. *Journal os Medicinal Plants Research*, v. 25, n. 5, p. 5999-6004, 2011.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan and Mint Mixture: A New Preservative for Meat and Meat Products. *Food Chemistry*, v. 107, n. 2, p. 845-852, 2008.

KANNER, J. Oxidative Process in Meat and Meat Products: Quality Implications. *Meat Science*, v. 36, p. 169-189, 1994.

KARIM, A. A.; BHART, R. Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 563-576, 2009.

KORKEALA, H.; MAKELA, P. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Vacuum-packed Cooked Ring Sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 9, p. 33-43, 1989.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technology*, v. 51, n. 2, p. 60-74, 1997.

KUBOW, S. Routes of Formation and Toxic Consequences of Lipid Oxidation Products in Foods. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 12, p. 63-81, 1992.

LIU, L.; KERRY, J. F.; KERRY, J. P. Effect of Food Ingredients and Select Lipids on the Physical Properties of Extruded Edible Films/Casings. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, p. 295-302, 2006.

LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effects of Chitosan Molecular Weight and Degree of Deacetylation on the Properties of Gelatin-based Films. *Food Hydrocolloids*, v. 26, n. 1, p. 311-317, 2012.

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

MARANGON, C. A.; MARTINS, V. C. A.; LEITE, P. M. F.; SANTOS, D. A.; NITSCHKE, M.; PLEPIS, A. M. G. Chitosan/gelatin/copaiba Oil Emulsion Formulation and Its Potential On Controlling The Growth Of Pathogenic Bacteria. *Industrial Crops and Products*, v. 99, p. 163-171, 2017.

MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, v. 13, n. 8, p. 833-839, 2005.

MELO, A. A. M. *Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (Rosmarinus officinalis L.) na conservação de carnes de frango desfiado*. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

MENEZES, N. M. C. *Efeito da adição de óleo essencial de orégano sobre a vida útil de presunto fatiado a vácuo: modelagem em condições isotérmicas e não isotérmicas*. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MOHAMMAD, O. T.; RAHMAN, N.; HAQUE, M. E.; KHAN, R. A.; DAFADER, N. C.; ISLAM, R.; NURNAB, M.; TONNY, W. Modification of Mechanical and Thermal Property of Chitosan-Starch Blend Films. *Radiation Physics And Chemistry*, v. 81, n. 10, p. 1659-1668, 2012.

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

OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Effect of Chitosan Coatings Enriched with Cinnamon Oil on the Quality of Refrigerated Rainbow Trout. *Food Chemistry*, v. 120, p. 193-198, 2010.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative Evaluation of the antibacterial Activities of the Essential Oils of *Rosmarinus Officinalis* L. Obtained by Hydrodistillation and Solvent Free Microwave Extraction Methods. *Food Chemistry*, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, S. P. L. F.; BERTAN, L. C.; RENSIS, C. M. V. B.; BILCK, A. P.; VIANNA, P. C. B. V. Whey Protein-based Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Polímeros*, v. 27, n. 2, p. 158-164, 2017.

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

PAGNO, C. H. *Efeito da adição de nanoestruturas, óleos essenciais e quitosana no desenvolvimento de filmes e coberturas biodegradáveis com propriedades antimicrobianas*. 2016. 177f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

PELLISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, Mechanical and Barrier Properties of Cassava Starch-chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, v. 57, n. 6, p. 7499-7504, 2009.

PERINEAU, F.; GANOU, L.; VILAREM, G. Studying Production of Lovage Essential Oils in a Hydrodistillation Pilot Unit Equipped with a Cohobation System. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 53, p. 165-171, 1992.

RAVI KUMAR, M. N. V. A Review on Chitin and Chitosan Applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, p. 1-27, 2000.

RODRIGUES, R. M. S. *Produção e aplicação de embalagens ativas biodegradáveis na conservação de presunto fatiado*. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

ROMANI, V. P.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; MARTINS, V. G. Active and Sustainable Material from Rice Starch, Fish Protein and Oregano Essential Oil for Food Packaging. *Industrial Crops and Products*, v. 97, p. 268-274, 2016.

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

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial Activity of Whey Protein Based Films Incorporated with Oregano, Rosemary and Garlic Essential Oils. *Food Research International*, v. 39, p. 639-644, 2006.

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

SILVEIRA, S. M.; JUNIOR, A. C.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R. W. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Selected Herbs Cultivated in The South of Brazil Against Food Spoilage and Foodborne Pathogens. *Ciência Rural*, v. 42, p. 1300-1306, 2012.

SHIH, F. F. Edible Films From Rice Protein Concentrate and Pullulan. *Cereal Chemistry*, v. 73, n. 3, p. 406-409, 1996.

SHOGREN, R. L.; BAGLEY, E. B. Natural Polymers as Advanced Materials: Some Research Needs and Directions. In: *Biopolymers*. Washington, 1999.(ACS Symposium Series, v. 723). cap. 1. p. 2-11.

SLONGO, A. P. *Uso de alta pressão hidrostática em presunto fatiado: avaliação físico-química e sensorial e modelagem do crescimento microbiano*. 143f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TAKAYAMA, C.; FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; DUNDER, R. J.; MANZO, L. P.; SOCCA, E. A. R.; BATISTA, L. M.; SALVADOR, M. J.; SOU-

ZA-BRITO, A. R. M.; FERREIRA, A. L. Chemical Composition of Rosmarinus Officinalis Oil and Antioxidant Action Against Gastric Damage Induced by Absolute Ethanol in the Rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 8, p. 677-681, 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; NILSUWAN, K. Emulsion Film Based on Fish Skin Gelatin and Palm Oil: Physical, Structural and Thermal Properties. *Food Hydrocolloids*, v. 48, p. 248-259, 2015.

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

UGALDE, M. L. *Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais*. 168 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai, Erechim, 2014.

VELDHUIZEN, E. J.; TJEERDSMAN-VAN BOKHOVEN, J. L. M.; ZWEIJTZER, C.; BURT, S. A.; HAAGSMAN, H. P. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 5, p. 1874-1879, 2006.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/Lipoxygenase Inhibitory Activities and Chemical Compositions of Selected Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 12, p. 7218-7225, 2010.

WONG, D. W. S.; GASTINEAU, F. A.; GREGORSKI, K. S.; TILLIN, S. J.; PAVLATH, A. E. Chitosan-Lipid Films: Microstructure and Surface Energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, n. 4, p. 540-544, 1992.

YUAN, G.; CHEN, X.; LI, D. Chitosan Films and Coatings Containing Essential Oils: The Antioxidant and Antimicrobial Activity, and Application in Food Systems. *Food Research International*, v. 89, p. 117-128. 2016.