

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

CIBELLI MAZZUCATO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE
FILMES DE PVC DOPADO COM ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM PARA O CONTROLE
MICROAMBIENTAL EM EMBALAGENS DE
ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
MARÇO 2013**

CIBELLI MAZZUCATO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE
FILMES DE PVC DOPADO COM ÓLEO
ESSENCIAL DE ALECRIM PARA O CONTROLE
MICROAMBIENTAL EM EMBALAGENS DE
ALIMENTOS**

**ORIENTADORA: PROF^a. Dra. KELLY C. DA SILVA BRABES
CO-ORIENTADOR: PROF^o. Dr. EVARISTO A. FALCÃO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS
MARÇO 2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

M478c Mazzucato, Cibelli.
Caracterização do potencial de filmes de PVC dopado com óleo essencial de alecrim para o controle microambiental em embalagens de alimentos / Cibelli Mazzucato. – Dourados, MS : UFGD, 2013.
73 f.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes.

Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Embalagens. 2. Policloreto de vinila. 3. Óleo essencial de alecrim. I. Brabes, Kelly Cristina da Silva.
II. Título.

CDD: 338.47



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Caracterização do potencial de filmes de PVC dopado com óleo essencial de alecrim para o controle microambiental em embalagens de alimentos**”, de autoria de **Cibelli Mazzucato**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes
(Orientadora - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Jonas da Silva Mota
Membro Examinador (UEMS)

Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 28 de março de 2013.

*“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”
(Fernando Pessoa)*

*“Messieurs, c'est les microbes, qui auront le dernier mot.”
(Louis Pasteur)*

*Aos meus pais Mariema e Ibraim,
por terem me dado a vida de presente e
aos meus amores Carol e Luciano por
darem sentido a ela.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos concedidas, por todas as oportunidades e pessoas especiais colocadas em minha vida.

À minha mãe Mariema Micheletto, sempre batalhadora, exemplo de força, luta e persistência e ao meu pai Ibraim Mazzucato Júnior, homem forte, de fibra, trabalhador, com jeito de menino e um admirável gosto em viver. Amo vocês profundamente.

À minha irmã, Carolina Mazzucato, pelo amor incondicional, pela amizade, lealdade, por todas as conversas, por todas as tentativas em me deixar alegre nos momentos difíceis (dançando na webcam), que mesmo estando longe, está sempre presente. Realmente é minha alma gêmea, é a luz da minha vida!

Ao meu amor, Luciano Melchiorre da Silva (meu lindo), por acreditar em mim, por todo apoio, incentivo, força e parceria. Por toda ajuda, companheirismo, cumplicidade e dedicação de sempre. Obrigada pela compreensão e paciência quando precisei estar ausente. Obrigada por ser um anjo em minha vida, te amo imensamente!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal da Grande Dourados, por ter proporcionado a realização do mestrado.

À Prof^a. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes pela orientação, compreensão, paciência, ensinamentos transmitidos ao longo do mestrado, por ouvir minhas inquietações, problemas e por muitas vezes enxugar minhas lágrimas “da vida e científicas” e acima de tudo pela confiança e amizade.

Ao Prof^o. Dr. Evaristo Alexandre Falcão pela coorientação e paciência ao me guiar em uma área totalmente desconhecida até então.

Ao Prof^o. Dr. Fábio Juliano Negrão por ter proporcionado a realização da parte laboratorial da pesquisa, pela presença na banca de avaliação deste trabalho e, principalmente, pelos ensinamentos transmitidos, confiança e amizade.

Ao Prof^o. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes pelos “churras” oferecidos, amizade e pela realização das análises estatísticas.

Ao Prof^o. Dr. Andrelson Wellington Rinaldi pelo apoio, conselhos, conversas, atenção e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof^o Dr. Jonas da Silva Mota pela participação na banca examinadora desta dissertação.

Aos meus companheiros de bancada, amigos, irmãos de mestrado e de coração, que tornam o laboratório um lugar de malucos, alto-astrol e divertido. Agradeço por toda ajuda e parceria durante a realização deste trabalho, sem a qual seria impossível concluir e, principalmente, por toda contribuição para meu crescimento acadêmico e pessoal. Cada um, a sua maneira, me ensinou a ser uma pessoa melhor. Regiane (Régis), Chaiane (Chai, “voa voa brabuleta”), Thiago (irmão), Kesia (“má”), Lujan (“japa”), Quézia (“boa”) e Karla (“a das muamba”), deixo à vocês meu agradecimento mais que especial e meu carinho por todos os momentos alegres, tensos e até de tristeza, pois sempre estiveram ao meu lado. Obrigada por estarem presente nessa etapa importante da minha vida. Levarei cada um de vocês no coração sempre e quero que nossa amizade seja cultivada a cada dia, mesmo com a inevitável distância!

Aos demais parceiros de laboratório Laís, Ronaldo, Milena, Renata, Juliana, Nayra, Nayara, Denise, Karina e Aline por toda colaboração, companheirismo e animação.

Aos técnicos da FCS Débora, Priscila, Mariana (“café nosso de cada dia”), Flora, Letícia e Júnior por todos os momentos de descontração, que sempre deixaram os meus dias mais alegres. Em especial, ao Carlos e Alexandra por todo apoio e ajuda valiosa em momentos complicados.

Ao William Falco (“Fofoleti”), pela grande ajuda e colaboração, por toda paciência, ensinamentos, conversas, conselhos e momentos de distração. Já considero um grande amigo.

Aos amigos Jonatam e Gustavo, por toda disposição em ajudar, apoio e amizade.

Ao Prof^o Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires pela utilização do fluorímetro e disposição para esclarecer minhas dúvidas.

Ao Prof^o Dr. Eriton Rodrigo Botero por ter participado da banca de qualificação e pelas sugestões dadas para a melhoria deste trabalho.

Ao Profº Dr. Lucas Pizzuti pelo pronto auxílio nas análises de Cromatografia Gasosa.

Ao Profº Dr. Gleison Antônio Casagrande pela colaboração e disposição em esclarecer minhas dúvidas.

Á Jéssica pela grande ajuda nas análises de Cromatografia Gasosa.

Ao meu amigo e parceiro de turma André Nakamura, por todos os momentos em que estive ao meu lado. Pelas caronas, conversas, saídas, conselhos, madrugadas em claro, por ouvir minhas aflições e desabafos. Espero que essa amizade seja para vida toda!

Á minha querida amiga Débora Bastos (“meu amor à primeira vista”). Obrigada por todo apoio, telefonemas, conversas, risadas e consultorias. Estará sempre em meu coração e presente em minha vida.

Aos demais amigos de turma Janina (Ruanita), Beto (Bebeto), Geny, Maria Alice (Maria Cecília), Rodolfo e Mirian por sempre estarem disponíveis para conversar, pelo apoio e incentivo. Sucesso a todos!

Ao tio João e tia Cris por todo carinho, atenção e preocupação. Agradeço a ambos pela hospedagem durante os primeiros meses do curso.

Aos meus queridos, tia Mila, vó Carmem, Tharcísio, Letícia, Cris (comadre), Marcione, Rosane e Orlando pelas orações diárias, que mesmo longe, estão comigo no coração, sempre me apoiando, com sentimentos, gestos, palavras e pensamentos.

Ao meu primo e amigo Juninho, pessoa que admiro muito e que mesmo sem saber me estimulou a trilhar o caminho acadêmico. Sinto orgulho em seguir seus passos.

Á Profª Giane Missirian pela conversa que tivemos a dois anos, que me fez realmente lutar por algo melhor e chegar até aqui.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Charles Chaplin)

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Refletância Total Atenuada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cm	Centímetro
CPP	Contagem Padrão em Placa
dm²	Decímetro quadrado
BEM	Eosina Azul de Metileno
EC	<i>Escherichia coli</i>
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
g	Gramma
h	Hora
IV	Infravermelho
LIA	Lisina Ferro
Mg	Miligrama
mL	Mililitros
Nm	Nanometro
NMP	Número Mais Provável
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
PCA	Plate Count Ágar
ppm	Parte por milhão
PVC	Policloreto de vinila
rpm	Rotação por minuto
THF	Tetrahidrofurano
TSI	Tríplice Açucar Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µL	Microlitros
XLD	Xilose-Lisina Desoxicolato
°C	Graus Celsius

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (mg/mL) do óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) frente a <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> sp, <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> e <i>A. niger</i>	41
Tabela 2. Estimativa da microbiota total do presunto fatiado e embalado com filmes puro e dopados, simulando a vida de prateleira de comercialização do produto.....	45

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela 3. Dados do crescimento microbiano de três repetições, doze tempos de análise e quatro concentrações. Os valores estão expressos em Log UFC/g.....	70
---	-----------

ANEXO II

Tabela 4. Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos.....	73
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Log UFC/g da contagem bacteriana, através da Contagem Padrão em Placa, em função do tempo para PVC puro (0%), PVC dopado com 30% de OE de alecrim, PVC dopado com 40% de OE de alecrim e PVC dopado com 50% de OE de alecrim.....	44
Figura 2. Espectro de fluorescência de uma amostra de presunto com excitação em 405 nm.....	49
Figura 3. Espectro de fluorescência do presunto embalado em PVC puro (0%), PVC dopado com 30%, 40% e 50% de óleo essencial de alecrim, analisados em 12 tempos (0h a 168h).....	50
Figura 4. Espectro de fluorescência de <i>S. aureus</i> ATCC 27664 e <i>E. coli</i> ATCC 25922 com excitação em 405 nm em solução salina.....	52
Figura 5. Espectro de fluorescência de <i>S. aureus</i> ATCC 27664 e <i>E. coli</i> ATCC 25922 com excitação em 405 nm.....	53
Figura 6. Espectro de fluorescência dos filmes de PVC puro e dos filmes de PVC dopados com óleo essencial de alecrim nas concentrações de 30%, 40% e 50%, com excitação em 405 nm.....	54
Figura 7. Espectro de fluorescência do óleo essencial de alecrim puro, com excitação em 405 nm.....	54
Figura 8. Espectro de absorção da região do infravermelho do óleo essencial de alecrim (50 µL).....	55
Figura 9. Espectro de absorção da região do infravermelho do filme de PVC puro	55
Figura 10. Espectro de absorção da região do infravermelho do filme de PVC puro, PVC dopado com 30%, 40% e 50% de OE de alecrim.....	56
Figura 11. Cromatograma do filme de PVC puro.....	57
Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de alecrim.....	57
Figura 13. Cromatograma do filme de PVC dopado com 40% de OE de alecrim.....	58

RESUMO

As embalagens prolongam a vida útil dos alimentos e preservam a qualidade do produto. Investimentos em novas tecnologias contribuem ainda mais para o aumento da qualidade e segurança dos alimentos, destacando-se o uso de substâncias antimicrobianas em embalagens, pois além da barreira física, prolongam a vida de prateleira do produto. O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) torna-se uma das alternativas viáveis para o uso em embalagens. O PVC (Policloreto de vinila) é um material muito utilizado como invólucro, sendo comum encontrá-los comercialmente, como embalagens de diversos tipos de alimentos perecíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de filmes elaborados a base de PVC, dopados com óleo essencial de alecrim em concentrações de 30%, 40% e 50%, sob a vida de prateleira de presunto fatiado e refrigerado. A ação antimicrobiana dos filmes foi avaliada através da técnica de Disco difusão em ágar adaptada, contra importantes patógenos como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Aspergillus niger* ATCC 6275. As análises, para o estudo da vida de prateleira, foram realizadas por meio da técnica de Contagem Padrão em Placas ao longo de 12 tempos (0h, 30 minutos, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h) determinando, assim, o perfil de crescimento microbiano. Análises complementares foram realizadas em todos os filmes utilizando as técnicas de Espectroscopia de Fluorescência, Espectroscopia por Infravermelho (FTIR) e Cromatografia Gasosa com Detector de Massa (CG-MS). As medidas de fluorescência foram realizadas paralelamente, no presunto, nos mesmos tempos estabelecidos para as análises microbiológicas. Os resultados alcançados revelaram que os filmes dopados com 40% de óleo essencial de alecrim foram os mais eficazes na inibição do crescimento microbiano, comparados ao PVC puro e indicam que a técnica de Espectroscopia de Fluorescência pode vir a ser um complemento no controle microbiológico de alimentos, sendo ainda necessários outros estudos nesse sentido para obtenção de informações mais conclusivas.

Palavras-chave: Embalagens, Óleo essencial de alecrim, Vida de Prateleira, PVC, Espectroscopia de Fluorescência.

ABSTRACT

The packaging prolong the food life and preserve the product quality. New technologies investments further contribute to the quality and food safety increasing, emphasizing the antimicrobial substances use in packaging, because further the physical barrier, they extend the product shelf life. The essential oil of rosemary becomes one of the viable alternatives for use in packaging. PVC (polyvinyl chloride) is widely used as casing, and it is common to find them commercially, like packaging kinds of various perishable food. The aim of this study was to evaluate the action of PVC-based films, doped with rosemary essential oil in concentrations of 30%, 40% and 50%, under the shelf life of sliced and refrigerated ham. The films antimicrobial activity was evaluated by the adapted disc diffusion technique in agar, against important pathogens such as *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Salmonella* spp. ATCC 13076, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Aspergillus niger* ATCC 6275. The analyzes for the shelf life study were performed by the Standard Plate Count technique over 12 times (0 h, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h , 96h), thus, determining the microbial growth profile. Complementary analyzes were performed on all films using the Fluorescence Spectroscopy, Infrared Spectroscopy (FTIR) and Gas Chromatography with Mass Detector (GC-MS) techniques. The fluorescence measurements were performed in parallel, on the ham, at the same times established for the microbiological analyzes. The achieved results showed that the films doped with 40% rosemary essential oil were the more effective in microbial growth inhibiting, compared to pure PVC and indicate that the Fluorescence Spectroscopy technique might be a complement in food microbiological control, being still necessary further studies in this direction for more conclusive information obtainment.

Keywords: Packaging, Rosemary essential oil, Shelf Life, PVC, Fluorescence Spectroscopy.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Condimentos.....	14
2.2 Óleos essenciais.....	15
2.2.1 Óleo essencial de alecrim.....	17
2.3 Embalagens.....	19
2.3.1 Embalagens antimicrobianas.....	21
2.3.2 PVC (Policloreto de vinila).....	23
2.4 Vida de prateleira.....	26
2.5 Espectroscopia de fluorescência.....	28
2.6 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	29
2.7 Cromatografia Gasosa.....	30
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Obtenção do óleo essencial de alecrim.....	32
4.2 Determinação da amostra.....	32
4.3 Síntese do Polímero.....	33
4.4 Ação antimicrobiana dos filmes	33
4.5 Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de alecrim.....	34
4.6 Caracterização das amostras de presunto.....	34
4.7 Perfil de crescimento microbiano em presunto fatiado embalado em filmes de PVC dopados com óleo essencial de alecrim.....	36
4.8 Análises Complementares.....	37
4.8.1 Testes por Espectroscopia de Fluorescência.....	37

4.8.1.1 Preparo das amostras bacterianas.....	38
4.8.2 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.8.3 Cromatografia Gasosa.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Ação antimicrobiana dos filmes por disco-difusão em ágar adaptada.....	40
5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de alecrim.....	41
5.3 Análises das amostras de presunto fatiado.....	43
5.4 Análise da cinética do crescimento microbiano em amostras de presunto fatiado.....	44
5.5 Comportamento das amostras de presunto fatiado na espectroscopia de fluorescência.....	49
5.7 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	54
5.8 Cromatografia Gasosa.....	57
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICE A.....	70
ANEXO I.....	72
ANEXO II.....	73

1 INTRODUÇÃO

As embalagens para alimentos são designadas, primeiramente, para proteger o produto, agindo assim, como uma barreira a agentes externos (RAMOS et al., 2008). Dentre as funções de uma embalagem, a mais importante é preservar ao máximo a qualidade do produto, criando condições que minimizem alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas (SOARES et al., 2009).

Contudo, o conceito tradicional de que esta função deve ser exercida por meio de uma mínima interação entre a embalagem e o produto está superado frente às várias tecnologias que vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas, que têm por princípio, justamente uma interação embalagem/produto como forma de preservar a qualidade e a segurança do alimento (RAMOS et al., 2008; SOARES et al., 2009).

Assim, há na indústria de alimentos uma tendência na substituição das embalagens tradicionais por novos compostos que possam contribuir significativamente para tornar os produtos cada vez mais saudáveis e prolongar sua vida de prateleira (RAMOS et al., 2008; DURANGO, SOARES, ARTEAGA, 2011). A incorporação de agentes antimicrobianos a embalagens é uma alternativa para o controle de patogenicidade ou degradabilidade dos alimentos em função do tempo de armazenamento e comercialização, pois além de proteger o produto do ambiente externo, inibe ou retarda o crescimento de micro-organismos nos alimentos, levando à diminuição de agentes conservantes adicionados a formulação de alguns alimentos (SANTIAGO-SILVA et al., 2009), que são vistos com desconfiança pelos consumidores (BRESSAN et al., 2007).

Embalagens com estas características são conhecidas como embalagens ativas, pois apresentam alguma outra função desejável. A embalagem ativa procura corrigir deficiências presentes na embalagem convencional. Neste segmento, nos últimos anos, o desenvolvimento envolvendo o uso de agentes antimicrobianos na embalagem merece destaque (OLIVEIRA et al., 2009).

Os filmes antimicrobianos são divididos em dois grupos. No primeiro, o agente migra para a superfície do produto, enquanto no segundo eles são efetivos contra o crescimento microbiano superficial, sem a necessidade de migração para o mesmo. Em ambos, um intenso contato entre o produto e o agente antimicrobiano é essencialmente necessário (HAN, 2003).

Para adequar o desejo do consumidor por produtos mais saudáveis e práticos, que geralmente possuem uma alta quantidade de agentes conservantes para prolongar sua vida de prateleira, o uso de óleos essenciais torna-se uma opção, pois são dotados de propriedades antimicrobianas e antioxidantes (BOTRE et al., 2010).

Além disso, existe a demanda crescente por produtos em porções menores e de fácil utilização, dessa forma, vem sendo ofertadas embalagens individuais para o público consumidor (KRÜCKEN-PEREIRA, ABREU, BOLZAN, 2002). Seguindo ainda esta tendência, o mercado oferece cada vez mais produtos fatiados dispostos nas tradicionais bandejas de isopor (Poliestireno) revestidas com filme PVC (Policloreto de vinila).

Este fato justifica o interesse por este estudo, pois o PVC é indiscutivelmente muito utilizado como invólucro de alimentos perecíveis e há uma busca crescente por antimicrobianos naturais. Portanto, a junção de uma das embalagens mais utilizadas atualmente aos óleos essenciais, surge como inovação e dá origem a uma promissora linha de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Condimentos

Condimentos são produtos compostos de uma ou diversas substâncias sápidas, de origem natural, com ou sem valor nutritivo, empregado nos alimentos com o fim de modificar ou acentuar o seu sabor. Seus produtos classificam-se em glutamato monossódico, sais sódicos dos ácidos ribonucléicos e especiarias ou condimento vegetal (BRASIL, 1978).

Os condimentos vegetais são produtos constituídos de partes de espécies vegetais, como raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e outras partes das plantas, utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (BRASIL, 2005).

O uso dessas plantas como recurso terapêutico, desde tempos remotos, se propaga até os dias atuais através de informações essenciais sobre os efeitos medicinais que produzem a partir do conhecimento popular acumulado ao longo dos anos, despertando, assim, o interesse em pesquisas das mais diversas áreas (ARASHIRO et al., 2011).

Os condimentos de origem vegetal possuem ainda, além das propriedades terapêuticas utilizadas na medicina popular, propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo então, aplicados na conservação de alimentos (SOUZA et al., 2004; MORAIS et al., 2009).

Os componentes existentes nos condimentos, os quais atribuem suas apreciadas propriedades, consistem de compostos como alcoóis, ésteres, aldeídos, terpenos, fenóis, ácidos orgânicos, entre outros compostos, apontados como potencial benéfico à saúde do homem devido a sua composição química. Existem várias maneiras de se utilizar os condimentos em alimentos, com a finalidade de usufruir suas propriedades, podendo-se usá-los frescos, secos, como extratos isolados ou como óleo essencial. (DEL RÉ, JORGE, 2012).

A ação contra micro-organismos de óleos essenciais tem sido relatada em diversos estudos, evidenciando que o emprego de OEs como agentes

antibacterianos é promissor, pois há uma tendência quanto ao uso de substâncias naturais de plantas, devido ao questionamento frequente sobre a segurança dos aditivos químicos. Este fato endossa o uso dos OEs como substituto de aditivos químicos em alimentos, pois possuem reconhecida ação antibacteriana de amplo espectro (TRAJANO et al., 2009).

A exigência do consumidor atual em adquirir um produto de qualidade, saudável, fresco e livre de aditivos, porém apresentando uma vida de prateleira longa, torna ainda mais atrativo a aplicação de OEs na conservação de alimentos. Há um aumento quanto uso de cebola, cravo, alho, gengibre, noz moscada, alecrim, orégano, entre outros; pois além dos benefícios à saúde apresentam ação contra micro-organismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos (CRUZ, PEREIRA, 2010).

2.2 Óleos essenciais (OEs)

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e aromáticos extraídos de diferentes partes das plantas através de diversos processos como, destilação a vapor (método comercialmente mais utilizado), pressão a frio e extração com dióxido de carbono supercrítico (BURT, 2004; STOJANOVIĆ-RADIĆ et al., 2010).

Os OEs são constituídos por compostos orgânicos derivados do metabolismo secundário de plantas. Alguns produtos resultantes do metabolismo secundário possuem funções ecológicas específicas, como a de atrair insetos polinizadores, favorecendo a reprodução ou com ação de proteção contra predadores, afastando-os, sendo não palatáveis e/ou venenosas. Também estão envolvidos em mecanismos de defesa contra diferentes patógenos, agindo como pesticidas naturais (GARCÍA, CARRIL, 2009).

Os OEs podem conter mais de 60 componentes em concentrações bastante distintas, caracterizando-se pela presença de compostos majoritários que determinam, em geral, sua propriedade biológica. Porém, há evidências de que componentes minoritários agem em sinergismo com os demais,

acentuando suas propriedades (BAKKALI et al., 2008; IRKIN, ABAY, AYDIN, 2011; MACHADO, BORGES, BRUNO, 2011; SANTOS et al., 2012).

A composição química de um OE pode variar amplamente devido a variados fatores como época de colheita, origem geográfica, manejo das plantas, forma de extração, armazenamento e partes distintas da mesma planta (BURT, 2004; RIBEIRO et al., 2012).

Atualmente, existem aproximadamente 3000 óleos essenciais conhecidos, sendo que cerca de 300 possuem importância comercial devido às suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antibacterianas, antimicóticas, antitoxigênicas, antiparasíticas e também inseticidas. (MACHADO, BORGES, BRUNO, 2011; BURT, 2004).

Os óleos essenciais possuem uma vasta aplicação farmacológica, sendo considerada vantajosa sua utilização, em longo prazo, sob a perspectiva da resistência bacteriana aos antibióticos (STOJANOVIĆ-RADIĆ et al., 2010). Este fato intensificou o interesse em pesquisas voltadas aos antimicrobianos naturais, principalmente advindos de óleos essenciais (JIANG et al., 2011), pois os OEs podem atuar como “atenuantes de virulência” ou ainda como “potencializadores” de antibióticos com ação limitada devido aos mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos (GONZÁLEZ-LAMOTHE et al., 2009).

Mesmo tendo sua atividade antibacteriana reconhecida há séculos, a indústria de alimentos, recentemente, considera o grande valor dos óleos essenciais aplicados como agentes antimicrobianos naturais (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI, 2012), pois, os consumidores buscam qualidade, produtos sem conservantes, alimentos seguros, com vida útil prolongada (NTZIMANI, GIATRAKOU, SAVVAIDIS, 2010) e a redução ou eliminação de aditivos químicos é uma exigência na indústria de alimentos (FISHER, PHILLIPS, 2008). Seguindo esta tendência, uma nova abordagem para evitar a proliferação de micro-organismos, é o uso de óleos essenciais e extratos de plantas como aditivos alimentares naturais (BUBONJA-SONJE, GIACOMETTI, ABRAM, 2011). No entanto, a dose necessária para a eficácia antimicrobiana em alimentos muitas vezes ultrapassa o seu nível de aceitação sensorial (JUNEJA, DWIVEDI, YAN, 2012).

O uso de óleos essenciais pela indústria de alimentos acontece por duas razões principais: pelo controle dos processos de deterioração natural (conservação de alimentos) e por inibir e/ou reduzir o crescimento de microorganismos deterioradores e patogênicos (segurança alimentar) (TAJKARIMI, IBRAHIM, CLIVER, 2010).

O uso de óleos essenciais em bens de consumo deverá aumentar no futuro, devido ao movimento do “consumo verde”, que estimula o uso e desenvolvimento de produtos derivados de plantas, como os consumidores e agências reguladoras são mais confortáveis com o uso de antimicrobianos naturais (KOTZEIDOU, GIANNAKIDIS, BOULAMATSI, 2008).

2.2.1 Óleo essencial de alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta aromática pertencente à família Lamiaceae. Essa planta é originária da região do mediterrâneo, porém é comum seu cultivo em várias partes do mundo, sendo um vegetal muito importante do ponto de vista farmacológico e botânico (SINGH, GULERIA, 2013).

Seu uso é vasto, podendo ser utilizado na culinária como flavorizante alimentar; em indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e sanitárias; na medicina popular é indicado para o tratamento de inúmeros males como espasmos musculares, cólica renal, dismenorreia, dificuldade respiratória, dores de cabeça, queda de cabelo, entre outros. O extrato de alecrim relaxa os músculos, tem efeito hepatoprotetor, atividade antitumoral (MOGHTADER, SALARI, FARAHMAND, 2011), antidiabética, antiulcerogênica, antiséptica e antireumática (YOSR et al., 2013).

Devido ao seu uso terapêutico ao longo dos anos, foi observado que o alecrim pode agir reduzindo a inflamação e também como analgésico leve. No entanto, os efeitos anti-inflamatórios ainda necessitam de estudos adicionais para que seja melhor estabelecido (YU et al., 2013).

Em estudo realizado por Sasaki e colaboradores (2013), a administração oral de extrato de alecrim apresentou um significativo efeito antidepressivo, com o aumento de dopamina, serotonina e acetilcolina em cérebro de ratos.

Além das propriedades acima mencionadas, o alecrim apresenta elevada atividade antioxidante. (VIUDA-MARTOS et al., 2010; YOSR et al., 2013; SINGH, GUERIA, 2013). Entre os óleos essenciais, a maioria das pesquisas feitas sobre propriedades antioxidantes eficazes pertencem a óleos extraídos de plantas da família Lamiaceae, principalmente do alecrim. (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI; 2012). Embora o mecanismo da atividade antioxidante não seja totalmente compreendido, existem algumas explicações aceitas, entre as quais estão: o seqüestro de radicais livres; doação de hidrogênio; quelação de íons metálicos e a inibição das reações enzimáticas (VIUDA-MARTOS et al., 2010).

O OE de alecrim é ainda um eficiente agente antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra fungos e leveduras (JUNEJA, DWIVEDI, YAN, 2012). Stojanović-Radić e colaboradores (2010) determinaram que o óleo essencial de alecrim afeta a membrana celular de bactérias Gram-positivas, porém são necessários outros testes para que o mecanismo exato desta atividade seja explorado. Realmente, danos estruturais que afetam a integridade da membrana celular têm sido geralmente usados para explicar a ação antimicrobiana de OEs e de seus componentes em bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (TROMBETTA et al., 2005; TAJKARIMI, IBRAHIM, CLIVER, 2010).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais depende da composição e concentração dos compostos químicos (RAHMAN et al., 2011). No OE de alecrim, os componentes que apresentam propriedades antimicrobianas são o α -pineno (2-25% da composição), cânfora (2-14%) e 1,8-cineol (3-89%) (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI; 2012). Outros compostos que aparecem, geralmente, em menores quantidades também são conhecidos pela efetiva atividade antimicrobiana, entre eles estão o canfeno, β -pineno (JIANG et al., 2011), borneol (MARZOUG et al., 2011), β -mirceno, verbenona (RIBEIRO et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que o α -pineno é o principal composto do OE de alecrim, seguido de 1,8-cineol, canfeno, β -mirceno e cânfora (Stojanović-Radić et al., 2010). No entanto, há outros relatos onde o componente 1,8-cineol apresenta-se em maior quantidade (SOUSA et al.,

2012), confirmando as pesquisas de que ocorrem alterações na composição química devido a inúmeros fatores (JORDÁN et al., 2013).

A ação antimicrobiana do óleo essencial de alecrim quando comparado ao α -pineno e 1,8-cineol se mostrou mais eficiente contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Gram-positivas); *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Gram-negativas) e apresentou notável atividade antifúngica contra *Candida albicans* (JIANG et al., 2011), o que indica a existência das interações sinérgicas entre os componentes do óleo essencial (JORDÁN et al., 2013).

O óleo essencial de alecrim possui ainda considerável atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* quando comparado com a ação do antibiótico tetraciclina (MOGHTADER, AFZALI, 2009).

O uso do OE de alecrim associado a antibióticos convencionais, no controle de micro-organismos patogênicos de origem alimentar, se mostra promissor. OE de alecrim apresentando como constituintes majoritários o α -pineno (19,8%), β -mirreno (24,2%), 1,8-cineol (22,2%) e verbenona (9,3%), se mostrou eficaz em modular a resistência de cepas de *E.coli* e *Salmonella* spp., quando associado com os antibióticos ampicilina, tetraciclina e nitrofurantoína. (RIBEIRO et al., 2012).

O óleo de alecrim demonstrou forte efeito antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes*, uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos, bem como em *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (JORDÁN et al., 2013) e *Campylobacter jejuni* (TAJKARIMI, IBRAHIM, CLIVER, 2010), demonstrando que pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade de produtos industrializados.

2.3 Embalagens

Com a Revolução Industrial, a proteção dos produtos passou a ser uma exigência devido às longas distâncias percorridas e ao cuidado no transporte e

distribuição. Desde então, a embalagem tornou-se um elemento importante para resguardar mercadorias (BORGHI, 2007).

O setor de embalagens vem a cada ano inovando e permitindo maior vida útil aos alimentos, o que explica o fato da indústria de alimentos ser a principal usuária de embalagens, correspondendo a mais de 50% do consumo total da produção. Os plásticos representam a maior participação no valor da produção correspondente a 37,08% do total. Até junho de 2012, foram lançadas 139.246 embalagens, 22% a mais do que no mesmo período de 2011, deixando o Brasil em 7ª colocação na produção, com um faturamento de aproximadamente R\$ 47 bilhões em 2012 (ABRE, 2013).

As embalagens são essenciais para a conservação de alimentos. No entanto, as embalagens tradicionais, que estão restritas a apenas proteger os alimentos de condições externas, necessitam de melhorias seja para estender a vida de prateleira dos produtos alimentícios ou para atender à demanda dos consumidores por produtos seguros, saudáveis, mais naturais e com menos conservantes (SOARES et al., 2009).

Seguindo esta tendência, novas tecnologias têm sido aplicadas visando melhorar ou monitorar a qualidade de alimentos, sendo destaque as embalagens ativas e inteligentes (SOARES et al., 2009).

As embalagens ativas possuem outras funções desejáveis, além de agirem como barreira física, podendo ser utilizadas para aumentar a vida de prateleira, minimizar a deterioração microbológica e inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, aumentando a qualidade e segurança do alimento. As embalagens inteligentes possuem um sistema inovador, ocorrendo uma “comunicação” com o consumidor, monitorando as condições do alimento (ESPITIA et al., 2012).

As embalagens inteligentes e ativas apresentam grande potencial para aplicação no setor de alimentos. Dentre elas, merecem destaque os filmes antimicrobianos, sendo um importante desenvolvimento em embalagens ativas (SOARES et al., 2009).

2.3.1 Embalagens antimicrobianas

A produção de filmes com atividade antimicrobiana tem como objetivo a redução ou inibição do crescimento de micro-organismos presentes principalmente na superfície do alimento, onde a maior parte das reações de deterioração ocorre. O desenvolvimento de micro-organismos é uma das causas responsáveis por esta deterioração e, conseqüente, diminuição do tempo de vida útil dos alimentos. A crescente preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos tem aumentado o interesse pelos filmes antimicrobianos (MORAES, 2007; ESPITIA et al., 2012).

Os agentes antimicrobianos mais comuns utilizados em filmes para alimentos são ácidos orgânicos, quitosana, nisina, lactoperoxidase, extratos e óleos essenciais de plantas. Para selecionar o antimicrobiano ideal, é preciso considerar a ação contra o micro-organismo alvo e também as interações possíveis entre o agente antimicrobiano, polímero e componentes presentes no alimento (CAMPOS, GERSCHENSON, FLORES, 2011).

A atividade do agente antimicrobiano, geralmente, esta relacionada a alterações na membrana celular, inativação de enzimas essenciais, destruição ou inativação do material genético. Os agentes podem ter ação bactericida ou bacteriostática e, para se preservar esta ou aquela ação, a concentração do agente deve ser mantida acima do mínimo necessário para inibir o crescimento do micro-organismo alvo, durante toda a vida útil do produto (HAN, 2003).

Os agentes antimicrobianos podem ser adicionados diretamente à matriz polimérica por incorporação quando o agente antimicrobiano é liberado para o alimento por difusão através do polímero (ESPITIA et al., 2012) ou por imobilização quando o composto tem sua ação apenas na superfície, não ocorrendo a migração do agente antimicrobiano para o alimento, pois este está imobilizado na superfície do polímero. Dessa forma a ação antimicrobiana acontece através do contato direto do agente com o alimento (LÓPEZ-RUBIO et al, 2004). Quando há a liberação do antimicrobiano ao longo do tempo, a cinética de crescimento microbiano e a atividade do agente na superfície podem ser equilibradas, garantindo mais segurança ao alimento (ESPITIA et al., 2012).

O desenvolvimento de filmes antimicrobianos tem sido alvo de muitas pesquisas e vários estudos evidenciam sua eficiência e aplicabilidade (SOARES et al., 2009), aumentando assim, o interesse nesta área de pesquisa. Estudos mostram filmes elaborados com uma variedade de materiais poliméricos incorporados a uma gama de substâncias antimicrobianas.

Filmes elaborados a partir da proteína isolada do soro do leite (*Whey Protein*), dopados com óleo essencial de alecrim, alho e orégano foram testados em bactérias patogênicas contaminantes de alimentos. O filme com óleo de orégano se mostrou mais eficaz contra as bactérias quando comparados aos demais óleos avaliados (SEYDIM, SARIKUS, 2006).

Yan e colaboradores (2013) desenvolveram filmes antimicrobianos a base de amido de milho com alginato de sódio, incorporados com dehidroacetato de sódio e extrato de alecrim. Estes filmes apresentaram ação contra isolados de *Escherichia coli* e *Aspergillus níger*, sendo este micro-organismo mais susceptível a ação do dehidroacetato de sódio. Os resultados deste estudo indicaram que os filmes desenvolvidos com dehidroacetato de sódio pode vir a ser uma boa opção para prolongar a vida de prateleira do alimento.

Embalagens biodegradáveis à base de amido de mandioca com adição de óleo essencial de canela e de cravo foram avaliadas contra micro-organismos comuns em produtos de panificação. Os filmes que apresentaram melhores resultados nas análises microbiológicas foram os dopados com óleo essencial de canela (KECHICHIAN et al., 2010).

Moraes e colaboradores (2011) desenvolveram e avaliaram filmes ativos aromatizados para aplicação em massa de pastel. Foram adicionados aos filmes ácido ascórbico e, estes tiveram sua ação testada *in vitro* contra o fungo *Penicillium* sp. Ainda foram realizadas a avaliação sensorial do produto e a análise microbiológica *in vivo*. Os filmes apresentaram atividade antimicrobiana satisfatória contra o micro-organismo testado e houve inibição do crescimento microbiano nas massas de pastel que estiveram em contato com os filmes aromatizados, apresentando também excelentes resultados sensoriais.

O potencial antimicrobiano de filmes a base de amido, incorporados com própolis vermelha foi avaliado como embalagem de folhas de alface. Testes

microbiológicos foram realizados para verificar a ação de 10 extratos de própolis frente a isolados de *Bacillus cereus*. Os resultados indicaram ação antibacteriana do filme para o micro-organismo analisado (ARAUJO et al., 2012).

Filmes antimicrobianos a base de celulose incorporados com nanocomposto e lactato de sódio foram desenvolvidos por Soares et al. (2007) para a conservação de carne bovina fresca. A atividade antimicrobiana do filme foi avaliada frente ao micro-organismo *Listeria monocytogenes* e os resultados demonstraram que o uso deste filme controlou o crescimento deste micro-organismo na carne, com redução de um ciclo logarítmico após cinco dias à temperatura de 10°C.

Filmes biodegradáveis incorporados com nanoemulsão de nisina (encapsulada e livre) foram eficazes contra *Listeria monocytogenes*, um importante patógeno de origem alimentar, podendo ser uma alternativa para aprimorar a segurança dos alimentos (IMRAN et al., 2012).

Enfim, apesar da infinidade de estudos referente à área de embalagens, as informações não são sistemáticas, pois os pesquisadores têm objetivos distintos ao projetar suas pesquisas. Portanto, um conhecimento mais profundo deve ser considerado para elucidar os benefícios na utilização destes produtos pela indústria de alimentos, não apenas sob o ponto de vista financeiro (CAMPOS, GERSCHENSON, FLORES, 2011).

2.3.2 PVC (Policloreto de Vinila)

Considerado o mais versátil dentre os plásticos, o PVC pode ter suas características alteradas dentro de um amplo espectro de propriedades em função da aplicação final, variando desde o rígido ao extremamente flexível. Essa variação permite que o PVC seja utilizado em inúmeras aplicações que vão desde tubos e perfis rígidos até filmes flexíveis utilizados para acondicionar alimentos, sangue, plasma e soro (RODOLFO JR, MEI, 2007; MADALENO et al., 2009).

O PVC se destaca entre os materiais plásticos presentes no nosso cotidiano. Ele tem papel importante na indústria e na sociedade, pois está

presente nas mais diversas aplicações, desde produtos médico-hospitalares e embalagens para alimentos até peças de alta tecnologia, como as usadas em equipamentos espaciais, passando por produtos aplicados à habitação e saneamento básico, dentre diversos outros setores. O PVC é atóxico, leve, sólido, resistente, impermeável, estável, não propaga chamas e é reciclável. Tem qualidades que o tornam adaptável a múltiplos usos, sendo o único plástico utilizado para a fabricação de bolsas de sangue (INSTITUTO DO PVC).

O PVC é obtido a partir de 56,8% de cloro, proveniente do cloreto de sódio e 43,2% de insumos provenientes de fontes não renováveis como o petróleo e o gás natural. O cloro, proveniente do sal marinho ou do cloreto de sódio mineral, presente na estrutura molecular do PVC torna sua molécula extremamente polar, aumentando sua afinidade e permitindo sua mistura com uma gama muito maior de aditivos quando comparado a qualquer outro termoplástico, possibilitando, assim, o preparo de formulações com propriedades e características adequadas a cada aplicação (RODOLFO JR, MEI, 2007).

Filmes flexíveis de PVC são amplamente utilizados em embalagens de alimentos, devido às seguintes características: transparência, resistência ao impacto, barreira contra gases e vapor de água, resistência química e fatores sanitários, que permitem aos consumidores a observação dos aspectos externos dos produtos (BARROS et al., 2011).

A indústria de alimentos incentiva a produção de embalagens inovadoras e o filme de PVC com função antimicrobiana tem grande potencial em prolongar a vida de prateleira de alimentos, reduzindo o desperdício e ampliando as fronteiras de exportação (CUSHEN et al., 2013). Filmes de PVC incorporados com compostos de prata têm ação antimicrobiana e podem ser utilizados como embalagens para alimentos, além de utensílios domésticos e dispositivos médicos (CHINKAMONTHONG, KOSITCHAIYONG, SOMBATSOMPOP, 2012).

Com base na resolução nº 17, de 17 de março de 2008, a qual regulamenta o uso de embalagens plásticas para aplicação em alimentos,

estabelece que os filmes de PVC são atóxicos e atendem a todos os requisitos de mercado (BRASIL, 2008).

No entanto, em meados do ano de 2004, a mídia divulgou que o uso de embalagens de PVC causa câncer. Com relação a essas afirmações a ANVISA liberou uma nota técnica esclarecendo que o PVC é um plástico autorizado para entrar em contato com alimentos, de acordo com a Resolução nº 105/99 que faz referência às Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plásticos em contato com Alimentos. Sabe-se que é necessária a adição de agentes plastificantes e, entre esses plastificantes, conforme a lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos estão autorizados os seguintes ftalatos: butila e benzila, dibutila, diciclohexila, dietila, diisodecila, dioctila, di-2-etilexila (DEHP). Para este último aditivo ser utilizado, existe a condição de uso na proporção de no máximo 3% da matéria plástica (PVC) para que o contato com qualquer tipo de alimento seja possível, principalmente com alimentos gordurosos. Diante dessas informações, a Anvisa acredita que não há necessidade de alerta à população com relação a restrição de uso do PVC (BRASIL, 2004).

Apesar de ser considerado seguro e atóxico, observa-se a fotodegradação do PVC em todos os espectros na faixa do visível e do ultravioleta, liberando ácido clorídrico e íons cloreto quando submetido às condições de luz em diferentes tempos. As embalagens de alimentos que utilizam o PVC são comumente expostas ao espectro de luz visível, tornando necessário observar seu comportamento frente sua realidade comercial, ou seja, nos produtos armazenados e comercializados em supermercados a fim de diminuir a liberação de compostos tóxicos ao alimento e conseqüentemente ao homem (KAMEDA, GRAUSE, YOSHIOKA, 2010).

A exposição deste polímero sem adição de estabilizantes ao calor, dependendo da intensidade e tempo de exposição, também pode causar a liberação de cloreto de hidrogênio (HCl), resultando em um processo de degradação (desidrocloração), revelado geralmente pela alteração na coloração para amarelo, até o marrom escuro (SOUZA, PESSAN, RODOLFO JR, 2006). Os estabilizantes térmicos atuam no PVC capturando e estabilizando os

íons cloreto formados, o que impede a propagação da reação e a consequente autocatálise do processo de degradação. Dessa maneira, o estabilizante térmico atua no controle da formação do HCl, evitando que o processo de degradação atinja um estágio que comprometa o desempenho do produto final (RODOLFO JR, MEI, 2007).

2.4 Vida de prateleira

A vida de prateleira de um alimento é definida como o tempo em que o produto pode ser armazenado em condições específicas, sem qualquer dano significativo na qualidade e aceitabilidade do mesmo (JENA, DAS, 2012). Diversos fatores podem influenciar a vida de prateleira de um alimento como condições de processamento, tipo de embalagem, microbiota inicial, tempo e temperatura de armazenamento (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários critérios podem ser utilizados para se determinar o fim da vida de prateleira de um alimento. A escolha desse fator limitante depende, no entanto, das características do alimento como a sua composição nutricional e a natureza das reações deterioradoras que mais limitam a sua qualidade (OLIVEIRA et al., 2013).

Na busca de processos que proporcionem aos produtos poucas alterações em suas características sensoriais e nutritivas, pesquisas têm sido direcionadas procurando gerar processos tecnológicos de baixo custo, cuja conservação seja baseada na combinação de fatores antimicrobianos, resultando em produtos similares aos frescos. Prever a vida de prateleira não é uma tarefa fácil. É preciso conhecer o mecanismo e a cinética das principais reações de deterioração (MOURA et al., 2007).

Além disso, a competitividade do mercado levantou a necessidade de se estabelecer critérios comuns a todos que indiquem, adequadamente, os limites (inicial e final) aceitáveis da microbiota contaminante para que possa garantir e manter a qualidade em todo o período vigente da vida de prateleira (POTHAKOS, SAMAPUNDO, DEVLIEGHERE, 2012).

Alimentos que possuem vida útil consideravelmente longa são, normalmente, submetidos a testes acelerados de vida de prateleira (TAVP).

Estes testes visam acelerar as taxas de transformação do alimento, mantendo os produtos sob condições de armazenamento relativamente severas, bem definidas e controladas (MOURA et al., 2007).

Já produtos altamente perecíveis, como os fatiados, além de ser um tipo de alimento extremamente manipulado, apresentam maior superfície de contato com o oxigênio, o que influencia diretamente em sua vida útil promovendo a oxidação lipídica e permitindo o crescimento de micro-organismos aeróbios. Como solução, encontra-se os produtos industrializados fatiados acondicionados a vácuo, sob atmosfera modificada ou em embalagens antimicrobianas (BRESSAN et al., 2007).

Armazenar produtos embalados em baixa temperatura é um método regularmente utilizado para preservar alimentos microbiologicamente instáveis, pois restringe o crescimento de micro-organismos. Desta forma, a indústria de alimentos estabelece padrões de qualidade microbiológica levando em consideração a carga microbiana do produto bruto, a tecnologia de produção e a embalagem utilizada, bem como as propriedades sensoriais exigidas pelos consumidores (POTHAKOS, SAMAPUNDO, DEVLIEGHERE, 2012).

A indústria de produtos cárneos utiliza, principalmente, o processamento de alta pressão (HPP - *high pressure processing*) para estender a vida útil e melhorar a segurança de alimentos “prontos para comer” (RTE – *Ready to eat*). Neste tipo de tratamento, geralmente ocorre uma redução de mais de quatro ciclos logarítmicos em micro-organismos deteriorantes e patogênicos mais comuns, resultando em maior segurança e validade do alimento (BAJOVIC, BOLUMAR, HEINZ, 2012).

Marcos e colaboradores (2008) avaliaram presunto cozido, previamente contaminado com *Listeria monocytogenes*, pressurizado a 400 MPa durante 10 minutos a 17°C, em combinação com filme antimicrobiano elaborados com alginato. Os resultados apresentaram uma redução de 3,4 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*. Logo, esta nova estratégia, mostrou-se eficaz para alcançar o fim da vida de prateleira em 60 dias.

O processo de deterioração da carne é causado principalmente pelo crescimento microbiano, particularmente pela acumulação de subprodutos metabólicos. O fim da vida útil pode ser definido por um limite máximo aceitável

de micro-organismos deterioradores ou um limite inaceitável de descoloração, alterações na textura, odor, sabor e formação de limos, que são causadas por estes micro-organismos. A maioria dos desenvolvidos modelos de vida de prateleira de produtos refrigerados descreve o crescimento destes micro-organismos, dependendo da temperatura, por ser o fator mais importante que influencia a vida de prateleira (KREYENSCHMIDT et al., 2010).

O processo de cozimento elimina praticamente todos os micro-organismos, porém pode ocorrer contaminação cruzada durante os processos de corte e embalagem. A taxa de deterioração depende da composição da microbiota inicial associada a outros fatores de processamento, como a permeabilidade ao oxigênio do material da embalagem e as flutuações de temperatura durante o transporte e armazenamento do produto (HOLM et al., 2012).

2.5 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é um fenômeno óptico que acontece em uma molécula após a incidência de luz. A energia luminosa é absorvida pela estrutura eletrônica elevando a energia dos elétrons da molécula a estados quânticos excitados e menos estáveis. Ao retornar ao nível fundamental de energia uma radiação eletromagnética é emitida de acordo com as características da molécula. Por isso a fluorescência é conhecida como uma “assinatura molecular” (ATKINS, DE PAULA, 2004).

O uso da espectroscopia de fluorescência na indústria de processamento de carnes para estimar os componentes deste alimento, torna-se vantajosa em relação aos métodos tradicionais, pois além da redução no tempo de análise a natureza de suas medidas são não-destrutivas (MOLLER et al., 2003).

Além disso, a técnica tem sido empregada na identificação de micro-organismos isolados. Há uma grande quantidade de moléculas presentes nas bactérias que fluorescem, tornando a espectroscopia de fluorescência uma técnica valiosa para determinar a deterioração microbiana em carnes. O processo de deterioração da carne depende da carga microbiana inicial, da

composição do produto e do ambiente. Entre tantas técnicas, a espectroscopia de fluorescência se mostra uma boa alternativa para detectar alterações microbiológicas e químicas em carnes (SAHAR, BOUBELLOUTA, DUFOUR, 2011).

Os procedimentos lentos e trabalhosos para o emprego da técnica Contagem Padrão em Placa não satisfazem as exigências de detecção rápida e eficiente de micro-organismos. Atualmente existem vários novos métodos que atendem esta exigência, no entanto, a maioria destes que estão disponíveis necessitam de um pré-tratamento das amostras, além do alto custo de alguns equipamentos. Nesse aspecto, a espectroscopia de fluorescência tem sido demonstrada como um método rápido, eficaz e tecnicamente simples (XUE et al., 2009).

2.6 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é uma técnica muito confiável, não-destrutiva que permite determinar diretamente e de maneira rápida propriedades diversas, sem a necessidade de um tratamento prévio da amostra, por este motivo tornou-se uma das principais técnicas analíticas, sendo muito utilizada devido a qualidade de rastreio, rapidez e baixo custo para análise. O FTIR pode ser acoplado a diferentes tipos de detectores e acessórios como Reflexão Total Atenuada (ATR) que permite a análise de uma gama de componentes sólidos ou líquidos (SOARES, REZENDE, FORTES, 2010).

A espectroscopia no infravermelho (IV) analisa os movimentos vibracionais das moléculas, o que leva a ser muito utilizada em estudos para conformação, identificação e interação com outras moléculas (ZAIA et al., 2011).

O espectro de infravermelho consiste no perfil gráfico da correlação entre a intensidade de absorbância (A) ou de transmitância (T) e a energia da radiação de IV, expressa em número de ondas. Esta técnica de análise pode ser aplicada em amostras sólidas, líquidas e gasosas (PRIMO, MENEZES, SILVA, 2011).

2.7 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, podendo ser combinada a diferentes sistemas de detecção apresentando um bom desempenho (VÉKEY, 2001). Acoplar um cromatógrafo ao espectrômetro de massas é relativamente simples (ARDREY, 2003) e une as vantagens da cromatografia como a eficiência de separação e alta seletividade, com as vantagens da espectroscopia de massas (EM), como a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade (VÉKEY, 2001).

A cromatografia gasosa é a técnica cromatográfica mais comum acoplada à espectrometria de massas junto com a cromatografia líquida de alta eficiência. Outras combinações são utilizadas com menor frequência como, por exemplo, a cromatografia em camada delgada (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é uma técnica usada para identificação de compostos voláteis e tem uma vasta área de aplicação (SIQUEIRA, ALVES, ZANI, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar filmes de PVC dopados com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) para o controle microambiental em embalagens para o fracionamento de alimentos de origem animal.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) do óleo essencial de alecrim frente aos micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Aspergillus niger* ATCC 6275;
- Desenvolver filmes a base de PVC puro e dopados com diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim;
- Determinar a ação antimicrobiana dos filmes sintetizados em estirpes de referência, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 e *Salmonella* sp. ATCC 13076;
- Avaliar a cinética de crescimento bacteriano do presunto fatiado, refrigerado e embalado com filmes de PVC;
- Utilizar a técnica de espectroscopia de fluorescência como análise complementar no estudo do perfil de crescimento microbiano em função da ação do óleo essencial de alecrim;
- Utilizar as técnicas de FTIR e Cromatografia Gasosa para caracterização do óleo essencial de alecrim e dos filmes dopados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal da Grande Dourados. As análises microbiológicas, elaboração dos filmes e medidas de fluorescência foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, da Faculdade de Ciências da Saúde.

As amostras dos filmes e do OE de alecrim foram analisadas através das técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e de cromatografia gasosa (CG-MS) no Laboratório de Óptica e de Substâncias Bioativas e Química Analítica, respectivamente, ambos da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia.

4.1 Obtenção do óleo essencial de alecrim

O óleo essencial de alecrim foi escolhido devido à facilidade na aquisição e pela comprovada ação antimicrobiana vista na literatura. O óleo foi obtido comercialmente em farmácia local sendo emitido, pela empresa fornecedora, um laudo de análise atestando o controle de qualidade do produto (Anexo I).

4.2 Determinação da amostra

O presunto fatiado foi o alimento escolhido para esta pesquisa por ser um alimento perecível, com curto prazo de validade e por apresentar riscos de contaminação com patógenos durante o pós-processamento, como falta de higiene no preparo do alimento, manipulação, processamento e estocagem inadequados, o que permite que micro-organismos se multipliquem até atingir níveis impróprios para o consumo. Deste modo, a embalagem antimicrobiana age em benefício do produto.

O presunto foi obtido em padaria local, respeitando as técnicas de assepsia no corte da peça e no fatiamento, minimizando a contaminação externa ou cruzada à microbiota do produto, em seguida foi transportado sob

refrigeração imediatamente ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde, para o preparo das unidades amostrais.

4.3 Síntese do Polímero

O polímero PVC (SIGMA) foi diluído em Tetrahidrofurano – THF – (DINÂMICA) na concentração de 3% (m/m) e deixado sob agitação em velocidade média, por aproximadamente 4 horas, em agitador magnético modelo 78 HW-I. Em seguida, esta solução foi dividida em partes para a adição do OE de alecrim em diferentes concentrações e novamente agitado por 15 minutos. Após esse período, as soluções foram dispostas em placas de Petri (8,0mL em cada uma) e colocadas em estufa a 35°C por aproximadamente quatro dias, até a formação de uma película fina e seca, resultando em filmes com as seguintes concentrações: PVC com 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40% e 50% de OE de alecrim, além do PVC puro, considerado o controle.

4.4 Ação antimicrobiana dos filmes

A técnica apresentada pela NCCLS (2003¹) foi adaptada para o teste de sensibilidade aos filmes de PVC puro e dopado com OE de alecrim por Disco-difusão.

Os filmes dopados, em todas as concentrações elaboradas, foram recortados em círculos com aproximadamente 1 cm de diâmetro e testados, microbiologicamente, por meio do método de disco-difusão em ágar, adaptado. A ação dos filmes foi avaliada frente as seguintes espécies: *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* sp. ATCC 13076.

Os discos de filmes foram colocados sobre a placa de Petri, contendo Ágar Mueller Hinton (HIMEDIA), após a semeadura do inóculo bacteriano ajustado na escala 0,5 de McFarland. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C. Estes testes foram realizados em triplicata.

4.5 Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de alecrim

A Concentração Inibitória Mínima do OE de alecrim foi determinada utilizando técnicas de microdiluição de acordo com as normas do NCCLS (2003²) para bactérias, NCCLS (2002¹) para leveduras e para fungos filamentosos foi utilizada a normatização NCCLS (2002²), todas adaptadas para a avaliação de OE. Esta análise foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Os microorganismos avaliados foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Aspergillus niger* ATCC 6275.

Os ensaios foram realizados preenchendo-se cada poço da microplaca com 95 µl de caldo Mueller Hinton (HIMEDIA), para os testes contra bactérias e 95 µl de caldo Sabourand (HIMEDIA) para os fungos (ZOGDA; PORTER, 2001).

O OE de alecrim foi diluído em água destilada esterilizada com Tween 80 (VETEC), ficando com uma concentração inicial de 2000 mg/mL. Desta solução, foram retirados 100 µl e adicionados ao primeiro poço de cada linha. Foi feito, então, uma diluição seriada até o poço nº 10, resultando em uma concentração final de 1,95 mg/mL. Em seguida, 5 µl de cada suspensão microbiana, devidamente ajustada na escala 0,5 de McFarland, foram dispensadas em todos os poços.

As microplacas foram incubadas a 35°C/24h para as análises em bactérias e leveduras, e a 28°C/72h para o teste em fungo filamentoso. A leitura foi feita visualmente. Considerou-se como CIM o poço com a menor concentração onde não houve crescimento microbiano. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.6 Caracterização das amostras de presunto

As amostras de presunto foram, primeiramente, avaliadas de acordo com as metodologias da APHA (2001) que é preconizada para análise de alimentos pela Resolução RDC nº 12, de 01 janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Para tal, foram utilizados os padrões microbiológicos sanitários para alimentos representados na legislação para *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, Coliformes Termotolerantes (45°C), além de contagem total de mesófilos aeróbios, sendo que este não apresenta parâmetro na legislação citada (anexo II).

A presença de *Salmonella sp.* foi analisada pesando-se 25 g de cada amostra, assepticamente. O presunto pesado foi depositado em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (OXOID) e incubado a 35-37°C, por 24 horas. Após este período, transferiu-se 1,0 mL da Água Peptonada Tamponada para o caldo Selenito (ACUMEDIA) e Rappaport-Vassiliadis (ISO FAR). Após o período de incubação (35°C/24h) foram feitas estrias, com o auxílio de alça de platina em placas de Petri com Ágar Bismuto Sulfito (ACUMEDIA) e Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD – ACUMEDIA). As placas foram incubadas por 24 horas a 35-37°C. As colônias típicas obtidas nas placas foram inoculadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI – HIMEDIA) e Ágar Lisina Ferro (LIA – HIMEDIA) e incubadas por 24 horas a 35-37°C, para confirmação preliminar.

Para a avaliação de coliformes termotolerantes e *E. coli* foi empregada a técnica do Número Mais Provável. Para o teste presuntivo, utilizou-se 1,0 mL das amostras, previamente diluídas em 9,0 mL de Citrato de Sódio (VETEC), em tubos contendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST - ACUMEDIA) e, estes, foram incubados em estufa a 35°C por 24-48h. Foram selecionados os tubos considerados positivos, ou seja, com turvação e produção de gás no tubo de Durham. Para o teste confirmativo, alíquotas de tubos positivos do caldo LST foram inoculadas em caldo *Escherichia coli* (EC - ISO FAR) e incubados em banho-maria por 48 horas a 44,5°C. Os tubos com crescimento e produção de gás no tubo de Durham, são considerados positivos para coliformes termotolerantes. Os tubos positivos do caldo EC foram selecionados para determinar o Número Mais Provável (NMP/g) a partir do número de porções positivas, utilizando-se a tabela do NMP, conforme preconiza a APHA (2001). Em seguida, para o isolamento de *E. coli*, foi estriado uma alçada dos tubos positivos de caldo EC, em placas com Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB - VETEC) e incubadas a 35-37°C por 24-48h.

Para *Staphylococcus* sp. cada amostra foi preparada pesando-se 25g assepticamente e transferidas para 225 mL de citrato de sódio (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, procederam-se diluições seriadas até 10^{-3} em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada. Alíquotas de 0,1 mL da diluição 10^{-2} e 10^{-3} foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Baird-Parker (HIMEDIA) adicionado de emulsão de gema com telurito de potássio (HIMEDIA), com o auxílio de alça de Drigalsky. Logo após, as placas foram incubadas a 35-37°C por 48 horas. Colônias típicas foram selecionadas para o teste de coagulase.

4.7 Perfil de crescimento microbiano em presunto fatiado embalado em filmes de PVC dopados com óleo essencial de alecrim

Os presuntos foram cortados, assepticamente, em pedaços de 1 g, e embalados em todos os filmes desenvolvidos (PVC puro e PVC dopado com 30%, 40% e 50% de óleo de alecrim). As amostras foram mantidas sob refrigeração a temperatura média de 4°C em refrigerador doméstico, sendo retiradas para análise de Contagem Padrão em Placa (CPP) nos tempos: 0 horas (imediatamente após ser embalado), 30 minutos após ser embalado, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e 168h.

Cada pedaço de presunto retirado da embalagem foi colocado em tubos contendo 9,0 mL de citrato de sódio (diluição 10^{-1}), sendo diluído logo após, em água peptonada (HIMEDIA) a 0,1% até a diluição 10^{-3} . Foram inoculadas 1,0 mL de todas as diluições em Ágar PCA (*Plate Count Agar* - HIMEDIA). As placas foram incubadas a 35°C por 48h e a leitura se deu através da contagem de colônias obtendo-se assim, o perfil de crescimento microbiológico.

As análises foram realizadas em duplicata em todos os procedimentos, com um total de três repetições completas do experimento. Após a determinação do perfil de crescimento, os dados foram avaliados.

4.8 Análises Complementares

4.8.1 Testes por Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas nas amostras de presunto e nos filmes utilizados como embalagem, nos mesmos tempos considerados para as análises microbiológicas. Além disso, foram realizadas medidas no OE de alecrim.

No presunto os testes foram feitos com a finalidade de se obter o espectro de fluorescência característico para este tipo de alimento e, se possível, para reconhecer o processo de crescimento dos micro-organismos no presunto e/ou detectar alterações microbiológicas no presunto (deterioração). Encontrando, assim, uma relação entre esta técnica e a de CPP, podendo servir futuramente como uma ferramenta para o controle microbiológico em presunto e demais alimentos cárneos.

A análise no OE de alecrim consistiu em traçar seu perfil de fluorescência e nos filmes a finalidade foi detectar a presença do OE de alecrim e, se possível, mensurar as diferentes concentrações entre os tratamentos

Para realização destes ensaios foi utilizado um espectrofluorímetro portátil da marca MM'Optics provido de uma fibra ótica em Y, um laser de diodo em 405 nm, um monocromador da marca Ocean Optics e um laptop com programa específico para aquisição dos dados experimentais.

Para ser ter um padrão na excitação e aquisição dos dados experimentais, foi realizado medidas de fluorescência com a amostra posicionada a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da fibra ótica. A medida de referência ou controle foi realizada incidindo-se o laser diretamente sobre a superfície de apoio (corpo negro).

Em seguida, foi aferida a intensidade de fluorescência do OE alecrim puro, sendo colocado em cubeta de quartzo. Incidiu-se o laser sobre as amostras e cada curva representada no gráfico foi obtida de uma média de 20 curvas. A aquisição dos dados experimentais foi feita de acordo com as especificações do fabricante.

4.8.1.1 Preparo das amostras bacterianas

As medidas de fluorescência também foram realizadas em duas espécies de bactérias, sendo *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Nos micro-organismos as análises foram realizadas com intuito de obter o espectro de fluorescência característico de cada espécie, para posterior comparação com as medidas feitas nos presuntos.

No entanto, foram realizadas duas metodologias. A primeira consiste no método proposto por Giana et al. (2013), onde os micro-organismos foram ajustados ao padrão 0,5 da escala de McFarland em solução salina e transferidas para uma cubeta de quartzo.

Para a segunda metodologia as células bacterianas foram precipitadas por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e a massa celular transferida para uma placa de petri limpa para posterior medida no fluorímetro.

As medidas nas bactérias foram realizadas utilizando-se o mesmo equipamento e protocolo descrito no item 4.8.1.

4.8.2 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Este ensaio foi realizado tanto nos filmes de PVC quanto no óleo essencial de alecrim. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento da marca Jasco, modelo FT-IR 4100 na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Para as medidas do OE de alecrim, foi utilizado o mesmo equipamento com o acessório ATR Pro 450-S (Refletância Total Atenuada). A aquisição dos dados foi feita através do software Spectra Manager, de acordo com o fabricante.

4.8.3 Cromatografia Gasosa

Estas análises foram realizadas com o objetivo de determinar os compostos majoritários do óleo essencial de alecrim e para averiguar se estes compostos estavam presentes nos filmes de PVC dopado com 40% do OE. Os

filmes desta concentração foram escolhidos por apresentarem melhor ação antimicrobiana e redissolvidos em THF para posterior análise.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um equipamento Varian 431/210 CG/EM. Foram utilizadas pequenas alíquotas de cada uma das amostras analisadas, todas diluídas em acetato de etila para que as injeções pudessem ser realizadas. As amostras foram injetadas no cromatograma com um tempo de 30 minutos cada e os respectivos espectros de massas foram gerados no software acoplado ao cromatograma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ação antimicrobiana dos filmes por disco-difusão em ágar adaptada

Esta análise foi realizada para avaliar o potencial antimicrobiano dos filmes dopados com OE de alecrim. As espécies testadas no antibiograma adaptado foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 27664.

O filme de PVC puro não apresentou ação inibitória em nenhum dos micro-organismos testados e, ainda, foi observado crescimento de massa celular na superfície de contato do polímero com o ágar. Este resultado era esperado, pois estudos demonstram a formação de biofilme bacteriano em superfícies a base de PVC puro. (SEIL; WEBSTER, 2011; JANJAROEN et al, 2013).

O composto polimérico de PVC dopado nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% de OE de alecrim não inibiu o crescimento dos micro-organismos. Contudo, as concentrações de 30%, 40% e 50% de OE de alecrim tiveram capacidade de inibir a formação de colônias apenas sob o filme. Resultado que foi considerado suficiente para o início das análises de vida de prateleira do presunto, pois a atividade antimicrobiana ocorreu na superfície de contato do ágar com o polímero. Pesquisas apontam que este fato é relevante, pois é na superfície do produto onde grande parte do processo de deterioração ocorre (SOARES et al., 2009).

Estudos confirmam a ação bactericida do OE de alecrim frente a isolados de *S. aureus*, sendo observados inibição do crescimento em todas as concentrações testadas (2,5%, 5%, 7,5%, 10% e 12,5%). Estas análises foram realizadas utilizando discos de papel filtro, confirmando a eficiência do óleo (CRUZ; PEREIRA, 2010).

No entanto, o método de difusão em meio sólido com discos de papel filtro embebidos com 20 µL do OE de alecrim na concentração absoluta (100%) para o teste de susceptibilidade antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 8739 e *S.*

enterica ATCC 6017 não apresentou atividade antibacteriana em nenhum dos micro-organismos (TRAJANO et al, 2009).

Antibiogramas utilizando discos de PVC dopados com OE de alecrim em concentrações de até 20% não apresentaram ação alguma contra os micro-organismos selecionados. Possivelmente, a interação do óleo de alecrim com o PVC exige concentrações maiores do OE para tornar a embalagem com eficiente ação antimicrobiana.

5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de alecrim

A concentração antimicrobiana do OE de alecrim foi determinada através da CIM contra micro-organismos patogênicos, cujos resultados estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (mg/mL) do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a *E. coli*, *Salmonella* sp, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger*.

Micro-organismo	CIM (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31,25
<i>Salmonella</i> sp. ATCC13076	15,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	7,81
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	7,81
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	3,91

O controle de esterilidade e de crescimento comprovou, respectivamente, a ausência de contaminação do meio de cultura, a viabilidade dos micro-organismos testados e a composição química do produto testado nesta investigação estão de acordo com os relatos da literatura.

Em trabalho realizado por Santurio et al. (2011), o OE de alecrim foi testado em concentrações de 3,2 a 0,1 mg/mL e não evidenciou atividade antibacteriana contra nenhuma das 79 amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de aves e de bovinos, encontrando-se em conformidade com os

resultados encontrados, que também não evidenciaram ação contra *E. coli* ATCC 25922 nas concentrações citadas.

No entanto, a ação do OE de alecrim avaliado contra *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Escherichia coli* resistente a Ampicilina (NCTC 10418), foi considerada excelente com valores de $1,52 \pm 0,04$ mg/mL e $1,72 \pm 0,04$ mg/mL, respectivamente. Além disso, o OE de alecrim também foi eficiente para inibição de *Staphylococcus aureus* NCTC 6571, com $0,30 \pm 0,01$ mg/mL e *Salmonella poona* NCTC 4840, com $1,16 \pm 0,03$ mg/mL (HUSSAIN et al., 2010). Comparando-se os resultados, nota-se que a ação antimicrobiana do OE de alecrim ocorre em concentrações menores às relatadas neste trabalho.

Em outro ensaio realizado para determinar a atividade antimicrobiana do OE de alecrim, foram utilizadas 25 plantas de composição química semelhante, porém diferentes em relação aos componentes majoritários. Os testes foram realizados contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e os resultados encontrados mostram que todas as plantas apresentaram forte atividade contra todos os micro-organismos avaliados, com exceção da *E. coli* em que apenas 40% das plantas tiveram ação inibitória (JORDÁN et al., 2013), resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, onde fica evidente a menor ação antimicrobiana contra a *E. coli* ATCC 25922.

Quanto aos testes de atividade antifúngica, comparados a outros estudos, foram encontrados, neste trabalho, valores maiores para inibição de *Candida albicans*. Cavalcanti, Almeida e Padilha (2011) demonstraram que o OE de alecrim apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 289065 e *Candida albicans* ATCC 40277, com valores de CIM iguais a $0,5625$ mg/mL e $2,25$ mg/mL, respectivamente. Os autores enfatizam que estas análises foram desenvolvidas em condições diferentes das estabelecidas pela NCCLS (2002), pois esta normatização não atende as especificidades dos OEs. Valores ainda menores foram encontrados em ensaios de Chobba et al. (2012), onde o OE de alecrim apresentou ação inibitória em concentrações de $0,18$ mg/mL.

Um ponto importante a ser discutido em estudos de ação antimicrobiana de produtos naturais é o tipo de metodologia utilizada (SANTURIO et al., 2011).

Em buscas na literatura, percebe-se que cada autor emprega a técnica para determinar a CIM de maneiras diferentes, adaptando-as de acordo com os próprios critérios e condições de análise. Alguns autores utilizam o método de difusão em disco para análise de CIM (MOGHTADER, SALARI, FARAHMAND, 2011; ITURRIAGA, OLABARRIETA, MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, 2012) enquanto outros utilizam a difusão em poços (RIBEIRO, VELOZO, GUIMARÃES, 2013) ou diluição em ágar (SILVA et al, 2009), além da microdiluição em caldo como apresentado neste trabalho.

A inexistência de uma técnica internacionalmente padronizada para avaliação de OEs permite que cada protocolo seja adaptado de maneiras distintas, o que compromete as comparações de resultados (VIUDA-MARTOS et al., 2008).

A variação de valores entre os resultados obtidos e os expostos na literatura comprova que não há parâmetro de comparação com outros estudos. Além disto, resultados diferentes podem ocorrer mesmo quando a metodologia utilizada é idêntica, pois existem características que devem ser levadas em consideração como a sensibilidade de linhagens diferentes de um determinado micro-organismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal que também pode possuir diferentes origens (SILVA et al., 2009).

5.3 Análises das amostras de presunto fatiado

Os resultados obtidos nestas análises foram comparados aos Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos, para carnes e produtos cárneos, da RDC nº 12 (Anexo II).

Para a contagem de coliformes a 45°C foi encontrado o valor de 10² UFC/g estando em conformidade com a legislação vigente que indica valores até 10³ UFC/g.

Nas análises para indicar presença/ausência de *Salmonella* sp., os testes preliminares com TSI e LIA indicaram valores positivos-presuntivos nas amostras avaliadas, não demonstrando, assim, conformidade com a resolução que preconiza a ausência de *Salmonella* sp. em 25g.

Para a contagem total de *Staphylococcus aureus* encontrou-se o valor de $1,9 \times 10^3$ estando dentro dos limites impostos pela resolução, com valores até $3,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001).

5.4 Análise da cinética do crescimento microbiano em amostras de presunto fatiado

Foram analisadas, através da CPP, as curvas de cinética do crescimento microbiano ao longo de 168 horas para cada tratamento. As horas iniciais indicam uma fase de adaptação do micro-organismo frente ao novo sistema imposto, não caracterizando uma tendência padrão nos diferentes tratamentos e nem mesmo nas repetições realizadas, o que é aceitável, pois se trata de interações complexas entre micro-organismos e o meio. Porém, ao longo do tempo observa-se um crescimento da população microbiana que, nos últimos tempos, se mantém praticamente constante para as amostras embaladas em PVC com 40% de OE de alecrim.

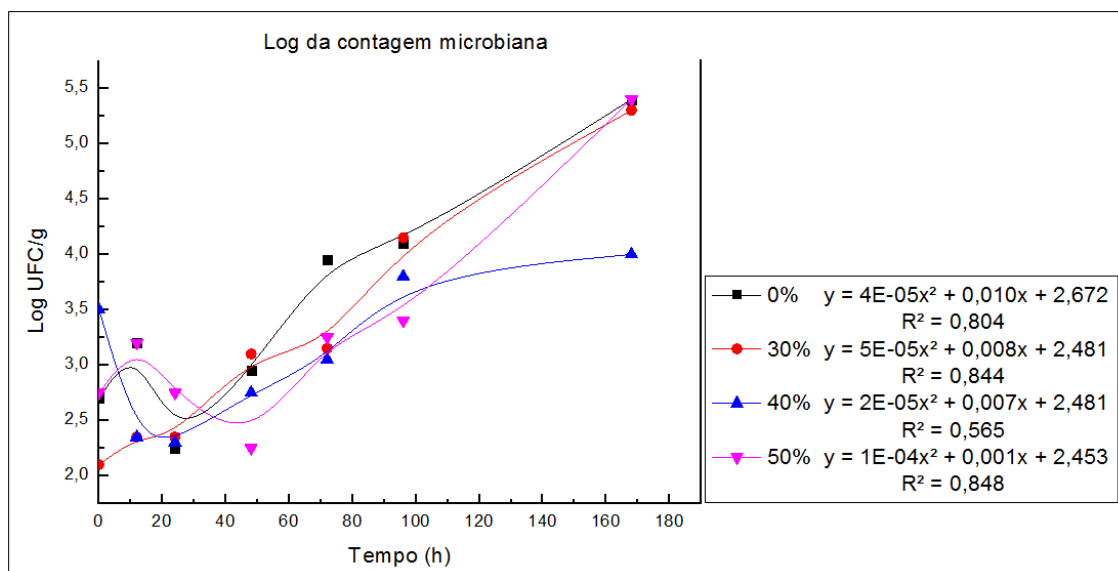


Figura 1: Log UFC/g da contagem bacteriana, através da Contagem Padrão em Placa, em função do tempo para PVC puro (0%), PVC dopado com 30% de OE de alecrim, PVC dopado com 40% de OE de alecrim e PVC dopado com 50% de OE de alecrim.

É possível perceber que o filme dopado com 40% de OE de alecrim quando comparado ao filme puro (controle), apresentou melhor resultado ao

longo do tempo, pois após 168 horas a contagem total de micro-organismos atingiu 4,3 Log UFC/g, enquanto nas amostras controle a contagem chegou ao valor de 5,6 Log UFC/g, como está ilustrado na Figura 1.

Ainda avaliando o comportamento microbiano ao longo do período estudado, de acordo com os resultados demonstrados na Tabela 2, pode ser observado que no intervalo de 0h a 8h houve uma redução de 1,65 e 0,5 ciclos logarítmicos para os filmes de 40% e 50%, respectivamente. O comportamento oposto ocorreu nas demais concentrações, onde houve um aumento da população microbiana.

Tabela 2: Estimativa da microbiota total do presunto fatiado e embalado com filmes puro e dopados, simulando a vida de prateleira de comercialização do produto.

Tempo (h)	Concentração de Óleo de alecrim (%)			
	0%	30%	40%	50%
0h	2,7	2,1	3,5	2,75
8h	3,0	2,55	1,85	2,5
0h-8h	0,3	0,45	- 1,65	- 0,25
24h	2,25	2,35	2,3	2,75
0h-24h	- 0,45	0,25	- 1,2	0
48h	2,95	3,1	2,75	2,25
0h-48h	0,25	1,0	- 0,75	- 0,5
72h	3,95	3,15	3,05	3,25
0h-72h	1,25	1,05	- 0,45	0,5
96h	4,1	4,15	3,8	3,4
0h-96h	1,4	2,05	0,3	0,65
168h	5,6	5,46	4,3	5,5
0h-168h	2,9	3,36	0,8	2,75

* Valores expressos em Log UFC/g

Considerando o prazo de validade comercial do presunto fatiado, no intervalo de 0h a 72h o filme dopado com 40% de OE apresentou uma redução

de 0,45 Log UFC/g na contagem populacional de micro-organismos do presunto, contrastando com os demais tratamentos, em que não houve redução. Comparando, neste mesmo intervalo de tempo, as contagens dos presuntos embalados com o filme puro e com o filme dopado com 40% de OE de alecrim, observa-se um aumento de 1,25 Log UFC/g no filme puro. Da mesma forma, no último tempo (168h) apesar de todas as concentrações apresentarem crescimento da microbiota, o filme de 40% revelou o menor valor no intervalo entre 0h e 168h, o que caracteriza um possível aumento na vida de prateleira do presunto fatiado sob o ponto de vista microbiológico.

Os resultados observados pela análise dos ciclos de redução logarítmica, apresentados na Tabela 2, entram em acordo com os dados estatísticos obtidos experimentalmente, representados pelas equações da reta na Figura 1, os quais demonstram a estimativa do tempo de vida de prateleira do presunto fatiado nos diferentes tratamentos, confirmando a melhor ação antimicrobiana do filme dopado com 40% de OE de alecrim.

Devido ao caráter inovador desta embalagem não foi possível encontrar na literatura trabalhos executados nas mesmas condições deste, o que dificulta a comparação para melhor discussão dos dados obtidos. Entretanto, muitas pesquisas relacionadas a embalagens antimicrobianas têm demonstrado eficiência e aplicabilidade para este tipo de material (SOARES et al., 2009).

Existem trabalhos relatados na literatura onde apresentam resultados satisfatórios quanto à inibição do crescimento microbiano em alimentos, com o uso de embalagens ativas elaboradas com diferentes materiais poliméricos e incorporadas com OE de alecrim ou extrato de alecrim.

Filmes de quitosana incorporados com argila do tipo montmorilonita e OE de alecrim foram avaliados quanto a sua propriedade antimicrobiana. Resultados mostraram que os filmes puros não apresentaram ação contra micro-organismos, contrastando com os filmes com concentrações de 1% e 1,5% de OE de alecrim que tiveram atividade antimicrobiana frente à *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* o que torna este produto interessante para o uso na preservação de alimentos se aplicados como embalagem ativa (ABDOLLAHI, REZAEI, GHOLAMALI, 2012).

Filmes comestíveis de carboximetilcelulose (CMC) incorporados com extrato de alecrim, na concentração de 2%, foram avaliados em carne bovina armazenada a 4°C durante 288 horas. As amostras de carne foram mergulhadas por 5 minutos em cada um dos filmes comestíveis (CMC e CMC incorporado com extrato de alecrim) e armazenadas sob refrigeração. As análises microbiológicas através da CPP aconteceram nos seguintes períodos: 0h (inicial), 96h, 192h e 288h. Os resultados indicaram que as amostras com filme antimicrobiano exibiram, após 288 horas, 4,55 Log UFC/g na contagem total de micro-organismos, enquanto nas amostras controle a contagem atingiu 6,75 UFC/g, já sendo considerado acima do limite ideal para carne fresca, o que pode prolongar a vida útil do alimento sob esta perspectiva (LIU et al., 2012).

No entanto, Melo e colaboradores (2012) precisaram incorporar concentrações mais altas de OE em seus filmes para obterem resultados satisfatórios. Esta pesquisa consistiu em incorporar OE de alecrim em filmes de acetato de celulose, com concentrações de 20% e 50%, para avaliação microbiológica de peito de frango refrigerado ($2\pm 2^{\circ}\text{C}$) ao longo de 6 dias. Filmes 0% (sem adição de óleo) e amostras controle (sem filmes) também foram avaliados. Os cortes de peito de frango foram montados em bandejas de poliestireno e envolvidos pelos filmes elaborados. As contagens de micro-organismos psicotróficos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva e *Salmonella* sp. foram realizadas nos tempos 0h (inicial), 72h e 144h. Os filmes com 20% de OE de alecrim não foi capaz de controlar significativamente o crescimento de coliformes totais e micro-organismos psicotróficos durante o período de armazenamento, enquanto que os filmes com 50% de OE mostrou-se eficiente, pois o crescimento foi controlado no decorrer do tempo, embora sem redução na contagem.

Possivelmente, a concentração ideal do OE adicionado ao polímero para que ocorra o controle de crescimento dos micro-organismos, deve ser ajustada de acordo com o material utilizado para a elaboração do filme. Em alguns casos, o agente microbiano pode migrar com mais facilidade para o meio

fazendo com que concentrações menores sejam suficientes para que a ação antimicrobiana ocorra de maneira satisfatória.

Em relação ao PVC, existem relatos de filmes de PVC incorporados com nanopartícula de prata como agente antimicrobiano. Em um estudo, filmes elaborados a partir de polietileno de baixa densidade (LDPE) e PVC contendo nanopartículas de prata à 100, 200 e 300 ppm foram avaliados quanto a propriedade antimicrobiana. Os filmes permaneceram em contato com a suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) por 30, 90, 150 e 210 minutos. As análises microbiológicas se deram nestes mesmos tempos, além do tempo 0 (zero). Os resultados demonstraram que os filmes de PVC apresentaram melhor função antimicrobiana quando comparado ao filme de LDPE. Os filmes de PVC à 100 ppm de nanopartículas de prata exibiram comportamento bacteriostático, enquanto que os filmes contendo 200 e 300 ppm apresentaram ação bactericida. As análises para determinar a percentagem de redução de bactérias indicaram uma redução de 99,9% para *Escherichia coli* quando em contato com o PVC contendo nanopartícula de prata a 200 ppm por 150 minutos. Os autores acreditam que a mudança na estrutura do PVC durante o processamento pode ter desempenhado um importante papel na atividade antimicrobiana do mesmo (CHINKAMONTHONG, KOSITCHAIYONG, SOMBATSOMPOP, 2012).

Uma pesquisa avaliou o potencial de migração de nanopartículas de prata em filmes a base de PVC quando em contato com superfície de peito de frango sob diferentes condições de armazenamento. Os filmes foram incorporados com nanopartículas de prata com medidas de 10 nm e 50 nm, em concentrações de 0,5% e 5%. Ficou demonstrado que inúmeros fatores interferem na quantidade de prata que migra do filme, tais como a quantidade, tempo e temperatura e que o tamanho das nanopartículas não influenciou significativamente na migração. Os resultados indicam uma migração de 8,85 mg/kg ou 0,84 mg/dm², valor abaixo do limite permitido pela União Europeia que é de 60 mg/kg ou 10 mg/dm². Além disso, estes resultados expressam valores bem abaixo dos níveis de migração observados para outras substâncias associadas ao PVC, como plastificante adipato de di-(2-etil-hexila) (DEHA). Utilizando informações sobre a toxicidade da nanopartícula de prata,

os resultados deste estudo demonstram que a ingestão de alimentos embalados com PVC incorporados com nanopartículas de prata não é capaz de exceder o limite de ingestão provisória que é de 16,02% e 0,16% para nanopartículas medindo 10 nm e 50 nm, respectivamente. A nanotoxicidade é uma área em que a falta de conhecimento é reconhecida. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar e avaliar os riscos (CUSHEN et al., 2013).

5.5 Comportamento das amostras de presunto fatiado na espectroscopia de fluorescência

Como técnica complementar ao estudo da cinética de crescimento microbiano, foi aplicada a técnica de espectroscopia de fluorescência. O espectro de fluorescência característico de uma amostra de presunto está ilustrado na Figura 2, apresentando uma banda larga de fluorescência na região entre 450 e 800 nm. Importante ressaltar que não foram encontrados na literatura, estudos realizados sob as mesmas condições e objetivos destes, o que dificulta a discussão dos resultados obtidos. Contudo, a espectroscopia de fluorescência vem sendo muito utilizada como ferramenta para medir índices de qualidade e alterações de parâmetros químicos em carnes e produtos cárneos (WOLD, MIELNIK, 2000; WOLD et al., 2002; MØLLER et al., 2003; SAHAR, BOUBELLOUTA, DUFOUR, 2011).

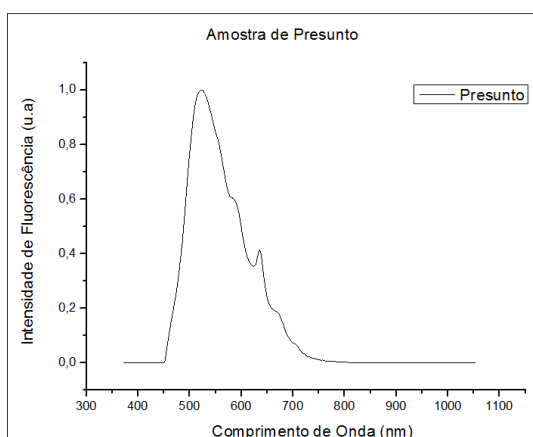


Figura 2. Espectro de fluorescência de uma amostra de presunto com excitação em 405 nm.

O espectro observado ocorre, provavelmente, devido à sobreposição da fluorescência dos diversos constituintes do presunto, incluindo sua microbiota que pode variar espacialmente na amostra ou de uma amostra para a outra. A literatura relata que bactérias fluorescem na região do visível. Giana et al. (2003) observaram que existe uma diferença perceptível na emissão de fluorescência entre três espécies avaliadas, indicando que há uma forte emissão na região entre 500 e 550 nm para *Escherichia coli* enquanto que para *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* a emissão de fluorescência é menos intensa, mas também ocorrem na mesma região.

Os espectros de fluorescência obtidos das análises dos presuntos embalados nos filmes de PVC dopados com OE de alecrim e, avaliados ao longo de 168h, estão expressos na Figura 3.

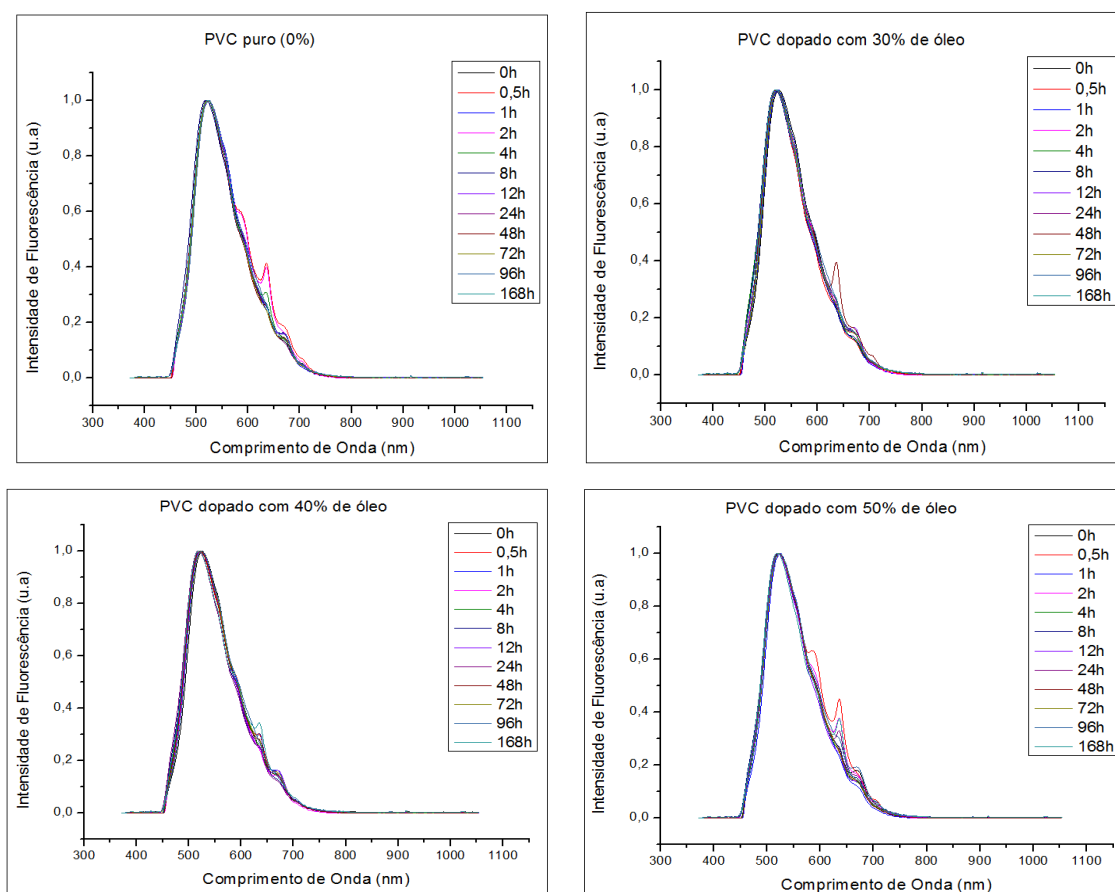


Figura 3. Espectro de fluorescência do presunto embalado em PVC puro, PVC dopado com 30%, 40% e 50% de óleo essencial de alecrim, analisados em 12 tempos (0h a 168h).

Pode ser observada uma banda larga de fluorescência na região entre 450 e 800 nm. Nota-se, em determinados tempos, um aumento na intensidade de alguns picos entre 600 e 700 nm, similar a Figura 2. Supondo que os micro-organismos se reproduzem, consomem os nutrientes do presunto, liberam metabólitos e provocam o processo de deterioração, é possível levantar a hipótese de que os micro-organismos podem ser os responsáveis, de forma direta ou indireta, pela flutuação da intensidade de fluorescência na região entre 600 e 700 nm. Porém, tais mecanismos ainda não são conhecidos sendo, ainda, necessários outros estudos para melhor entender esses processos.

Avaliando ainda os espectros da Figura 3, é possível perceber que nas amostras embaladas com o PVC dopado com 40% de OE de alecrim, em nenhum momento do experimento as bandas entre 600 e 700 nm se tornam tão evidentes e bem definidas como para as amostras embaladas com filmes das demais concentrações, o que pode ter relação com a contagem microbiológica, visto que as amostras embaladas com filme de 40% de OE de alecrim foram as que apresentaram melhores resultados quanto ao controle do crescimento microbiano. Dessa forma, apesar das flutuações que ocorreram, devido à heterogeneidade das amostras, pois é nitidamente visível que o presunto apresenta diferença de coloração em pontos distintos, e ainda, por se tratar de um produto orgânico, onde a quantidade inicial de micro-organismos também é variável, a técnica conseguiu identificar diferenças entre as amostras, indicando também um melhor efeito do filme dopado com 40% de OE de alecrim no controle do crescimento das bactérias.

Buscando estabelecer uma relação entre a técnica tradicional de contagem microbiológica (CPP) e a técnica de espectroscopia de fluorescência para o controle e/ou identificação de micro-organismos em alimentos e também com a finalidade de identificar a procedência dos picos de fluorescência encontrados no estudo do presunto, foi realizado um estudo da fluorescência de duas espécies de bactérias – *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 27664.

Inicialmente utilizou-se a metodologia proposta por Giana et al. (2003). Os micro-organismos avaliados através da espectroscopia de fluorescência apresentaram os perfis que estão ilustrados na Figura 4.

Os espectros apresentam picos na região entre 450 e 650 nm. O pico que aparece em, aproximadamente, 470 nm ocorre devido ao espalhamento Raman da água utilizada para a diluição da suspensão bacteriana, enquanto que os picos entre 500 e 650 nm podem ser atribuídos ao perfil de fluorescência dos micro-organismos avaliados, fato que coincide com o resultado exposto por Giana et al. (2003).

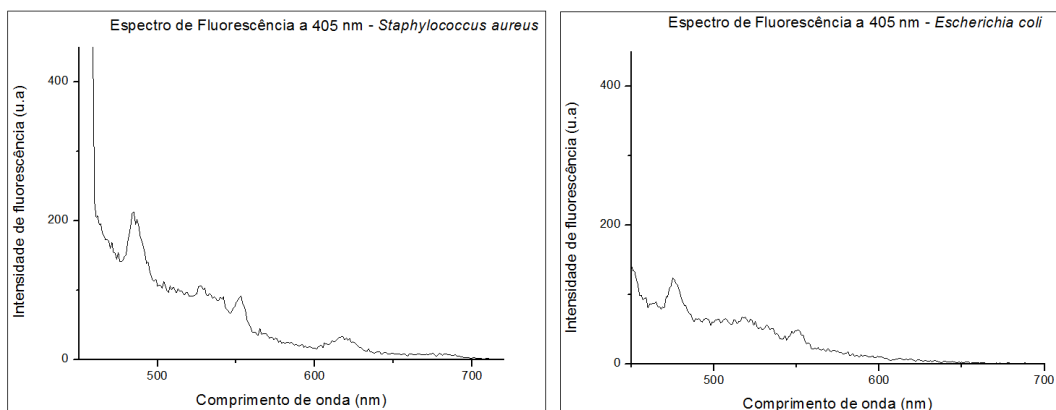


Figura 4. Espectro de fluorescência de *S. aureus* ATCC 27664 e *E. coli* ATCC 25922 com excitação em 405 nm em solução salina.

Entretanto, relacionando os espectros do presunto com os obtidos através das medidas nos micro-organismos, não foi possível estabelecer, de maneira satisfatória, uma relação entre os perfis de fluorescência. Era esperado que os picos encontrados entre 600 e 700 nm na Figura 3 fosse possivelmente provenientes de micro-organismos.

Dessa forma, uma segunda metodologia foi elaborada para a obtenção das medidas de fluorescência, de maneira que a concentração de bactérias foi consideravelmente aumentada e também, devido ao processo de centrifugação, a contribuição da solução salina no espectro de fluorescência foi reduzida. Os resultados obtidos para as medidas de fluorescência nas amostras de culturas puras utilizando-se esta metodologia estão ilustrados na Figura 5.

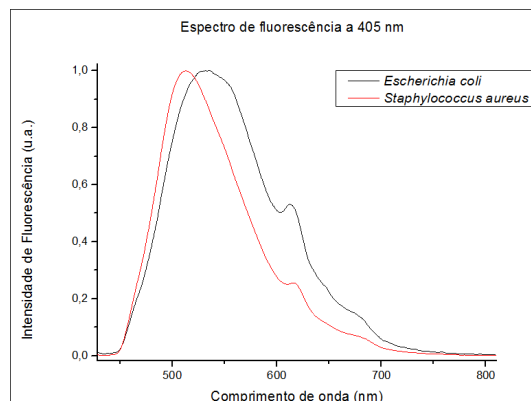


Figura 5. Espectro de fluorescência de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC com excitação em 405 nm.

Os espectros apresentam uma banda larga entre 450 e 750 nm, assemelhando-se aos espectros demonstrados na Figura 3. Além disso, notam-se picos característicos da região entre 600 e 700 nm. Comparando as Figuras 3 e 5 é possível dizer que, muito provavelmente, os picos entre 600 e 700 nm observados na fluorescência do presunto são devido às bactérias nele presentes. Portanto, é plausível alegar que a técnica de espectroscopia de fluorescência foi capaz de determinar a presença e a ação de microorganismos no presunto.

5.6 Comportamento dos filmes de PVC na espectroscopia de fluorescência

Para analisar os filmes de PVC utilizados nos estudos do perfil de crescimento microbiano em presunto e, principalmente, para determinar as possíveis diferenças entre o filme de PVC puro e os filmes com diferentes concentrações de óleo essencial de alecrim, aplicou-se a técnica de fluorescência. Os espectros de fluorescência obtidos para um filme de PVC puro quando excitado por um laser em 405 nm, como é demonstrado na Figura 6, apresenta uma banda larga na região entre 450 e 700 nm com pico máximo próximo de 550 nm.

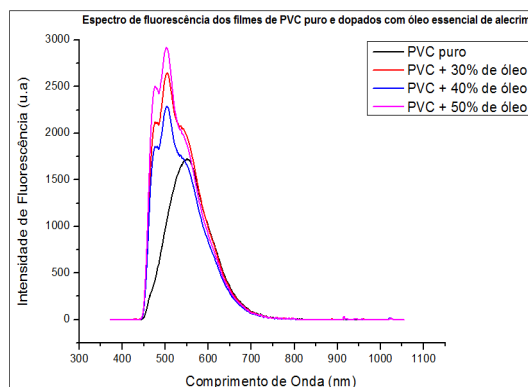


Figura 6. Espectro de fluorescência dos filmes de PVC puro e dos filmes de PVC dopados com óleo essencial de alecrim nas concentrações de 30%, 40% e 50%, com excitação em 405 nm.

Ao analisar os filmes dopados com OE de alecrim, também expostos nas Figuras 6, é possível observar uma clara mudança na forma dos espectros, onde ocorre o surgimento de novas bandas de fluorescência mais próximas ao violeta. Tais bandas podem ser atribuídas ao OE de alecrim, já que o seu perfil de fluorescência, ilustrado na Figura 7, apresenta o mesmo comportamento.

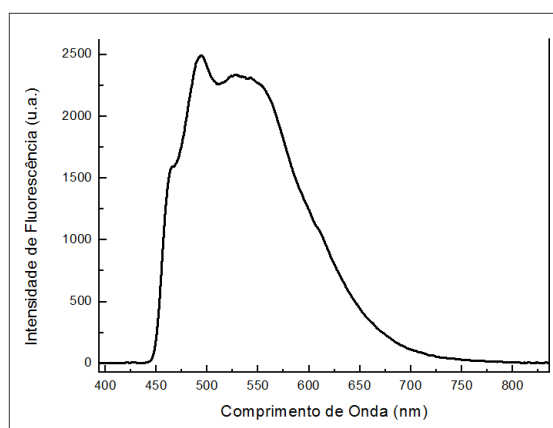


Figura 7. Espectro de fluorescência do óleo essencial de alecrim puro, com excitação em 405nm.

5.7 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A figura 8 demonstra o espectro de absorção na região do infravermelho do OE de alecrim e apresenta picos aproximadamente em 700 e 3600 cm^{-1} , que são representações de grupos químicos reconhecidos. Os picos da região

entre 2800 a 3000 cm^{-1} são característicos de substâncias carboniladas, saturadas e hidrofílicas.

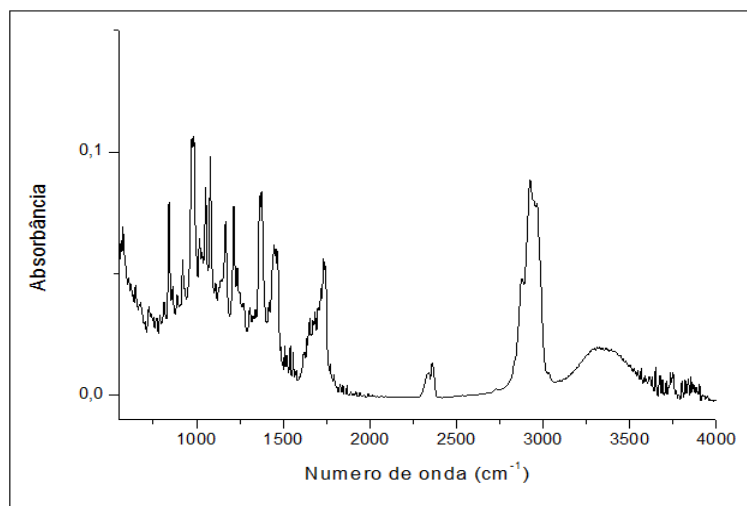


Figura 8. Espectro de absorção na região do infravermelho do óleo essencial de alecrim (50 μL).

A Figura 9 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho do PVC puro. Observa-se, picos característicos de substâncias com ligações saturadas entre 2800-3000 cm^{-1} e 1300-1500 cm^{-1} .

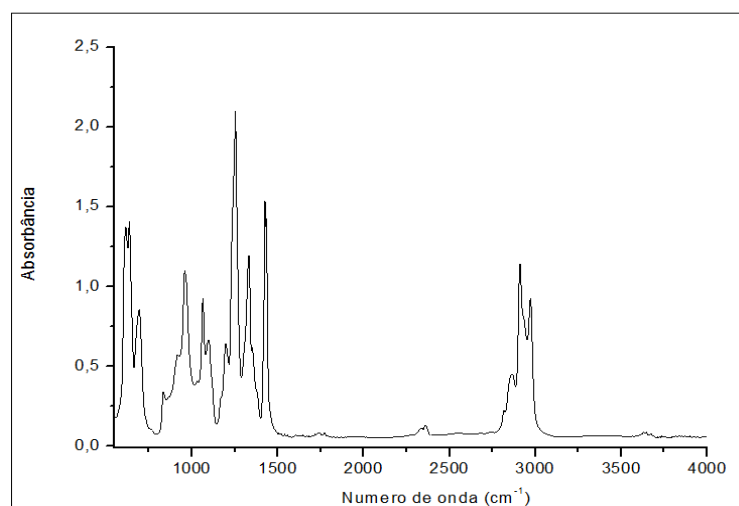


Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho do filme de PVC puro

Comparando-se as Figuras 8 e 9 é possível notar um pico em comum na região entre 2000-3000 cm^{-1} , demonstrando que mesmo sendo substâncias

distintas há semelhança nos picos apresentados nos espectros. As principais diferenças entre os espectros apresentados nestas figuras são os picos demonstrados em torno de 1750 cm^{-1} .

A absorção do pico entre $1600\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ é característica de estiramento de C=O de ácidos carboxílicos que podem ser relacionados à presença de terpenóides e flavonóides, que pode ser atribuído a cânfora que consiste num terpeno e apresenta-se como um dos compostos majoritários do OE de alecrim (ANGIONI et al., 2004).

A Figura 10 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho dos filmes de PVC puro e dopados com OE de alecrim em diferentes concentrações, demonstrando picos em comum.

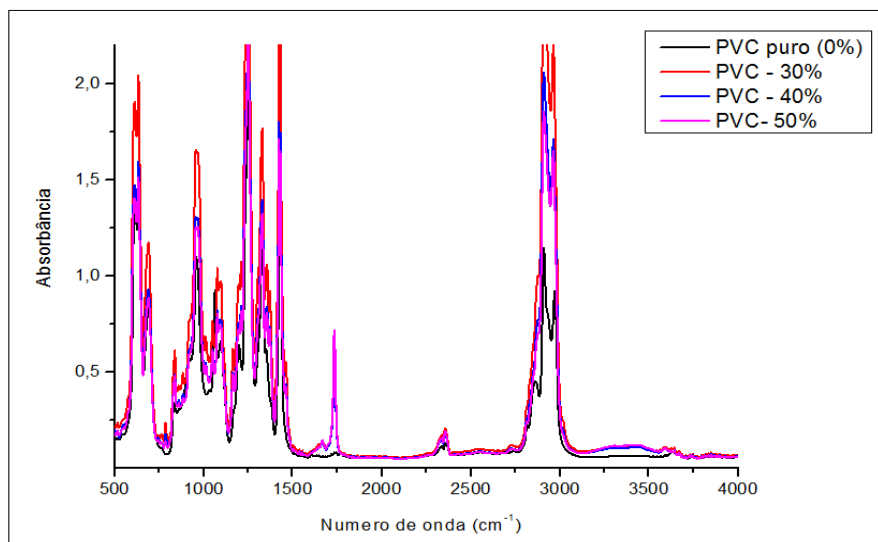


Figura 10. Espectro infravermelho do filme de PVC puro , PVC dopado com 30%, 40% e 50% de OE de alecrim.

Contudo, ao se observar o comportamento obtido pelos filmes dopados em relação ao puro comprova-se que há modificações na composição. Os filmes dopados apresentam picos nas regiões entre $1500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ e $3200\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$. Nos filmes puros a presença desta banda não foi observada, o que indica que o OE de alecrim foi incorporado aos filmes dopados.

5.8 CROMATOGRAFIA GASOSA

As análises cromatográficas do filme de PVC puro apresentou o cromatograma exposto na Figura 11, revelando um composto derivado do PVC.

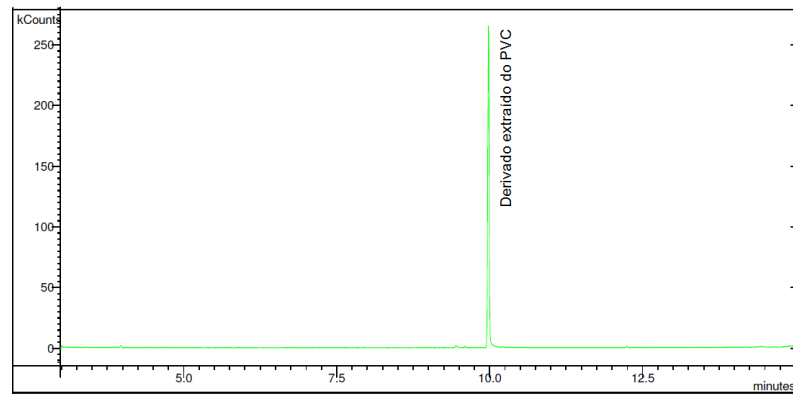


Figura 11. Cromatograma do filme de PVC puro

As análises de cromatografia gasosa do OE essencial de alecrim apresentaram como compostos majoritários o 1,8 cineol, cânfora e α -pineno como ilustra a Figura 12.

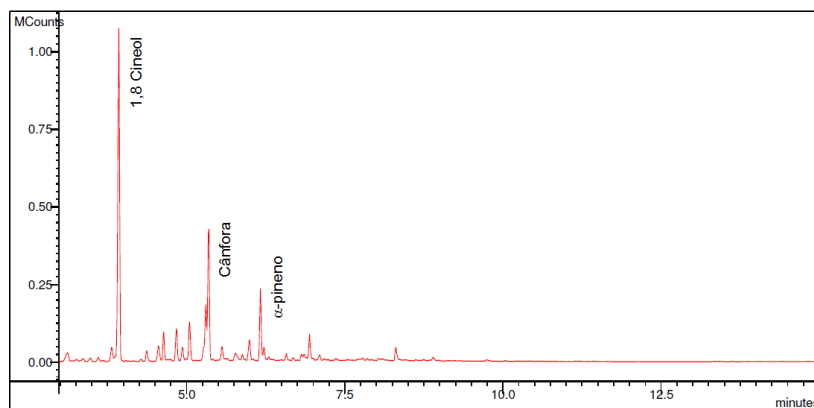


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de alecrim

Resultados similares são encontrados em outros trabalhos que apontam estas mesmas substâncias como compostos majoritários do OE de alecrim. Hussain et al. (2010) relatam que análises cromatográficas demonstram que 1,8 cineol, cânfora e α -pineno estão entre os compostos mais abundantes do

OE de alecrim avaliado. Dados análogos também foram descritos por Mounchid et al. (2004), Alnamer et al. (2012), Jordán et al. (2013) e Yors et al. (2013).

As análises realizadas nos filmes de PVC dopado com 40% de OE de alecrim apresentaram o cromatograma ilustrado na Figura 13, onde é visível a presença de compostos do OE de alecrim.

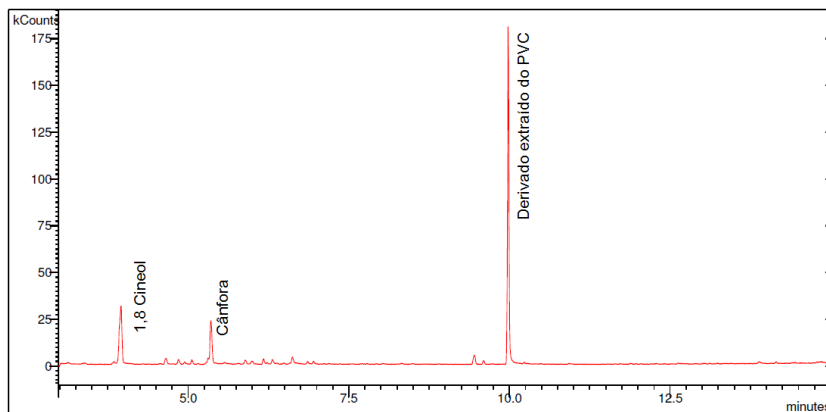


Figura 13. Cromatograma do filme de PVC com 40% de OE de alecrim.

Portanto, pode-se afirmar que o óleo está incorporado ao filme de PVC, o que confere a este material atividade antimicrobiana devido aos compostos que majoritariamente possuem comprovada ação contra micro-organismos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A concentração inibitória mínima do OE de alecrim apresentou resultados satisfatórios frente aos micro-organismos testados;
- Os filmes a base de PVC sintetizados em concentrações de 30%, 40% e 50% de óleo essencial alecrim e comparados ao filme de PVC puro, mostram atividade antimicrobiana eficiente;
- Os filmes desenvolvidos a base de PVC dopado com 40% de OE de alecrim apresentaram ação contra micro-organismos contaminantes do alimento testado;
- As análises microbiológicas mostraram que o filme de 40% foi o mais eficaz no controle do crescimento de micro-organismos presentes no presunto ao longo do tempo;
- A técnica de fluorescência foi capaz de detectar a presença do óleo essencial de alecrim em todos os filmes dopados avaliados e tem potencial sensibilidade para determinar a presença de micro-organismos no presunto. No entanto, ainda se faz necessário estudos mais detalhados para obtenção de resultados mais conclusivos.
- De acordo com as análises cromatográficas e FTIR foi possível demonstrar que o óleo essencial de alecrim foi incorporado aos filmes de PVC.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 2012.

ABRE, Associação Brasileira de Embalagens. Disponível em: <<http://www.abre.org.br/setor/dados-de-mercado/>> Acesso em: 10 jan. 2013.

ALNAMER, R.; ALAOU, K.; BOUIDIDA, E.; BENJOUAD, A.; CHERRAH, Y. Psychostimulant activity of *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Journal of Natural Products**, v. 5, 2012

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 2001.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, 2004.

ARASHIRO, M.P.; ZIROLDO, D.F.; YAMAGUCHI, M.U.; SARTOR, C.F.P.; PATRONI, S.M.S.; D'OLIVEIRA, P.S.; CORTEZ, L.E.R. Cultivo consorciado entre *Achillea millefolium* L. e *Rosmarinus officinalis* L. e seu efeito no rendimento do óleo essencial, biomassa e atividade antimicrobiana e pilates. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, 2011.

ARAUJO, Y.L.F.M.; SOUZA, C.O.; DRUZIAN, J.I.; PADILHA, F.F.; ORELLANA, S.C. Uso de biofilme de amido à base de própolis vermelha para a conservação de folhas de alface (*Lactuca sativa*). **Scientia Plena**, v. 8, 2012.

ARDREY, R. E. Liquid chromatography-mass spectrometry, 2003. Disponível em: http://books.google.com.br/books?id=f1QiHP3wsAcC&pg=PA1&dq=Ardrey,+R.+E.+%3B+Liquid+Chromatography-Mass+Spectrometry:+An+Introduction,+Wiley:+Huddersfield,+2003.&lr=&hl=pt-BR&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 03 fev. 2013.

BAJOVIC, B.; BOLUMAR, T.; HEINZ, V. Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. **Meat Science**, v. 92, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, 2008.

BARROS, H.D.; ZAMITH, H.P.S.; BAZÍLIO, F.S.; CARVALHO, L.J.; ABRANTES, S.M.P. Identification of fatty foods with contamination possibilities by plasticizers when stored in PVC film packaging. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 31, 2011.

BORGHI, A.P. História da embalagem no Brasil. **Comunicação e Inovação**, 2007.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, 2010.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. Padrões de identidade e qualidade para os alimentos e bebidas.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 17 de março de 2008. Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Nota técnica. 2004.

BRESSAN, M.C., et al. Influência na embalagem na vida útil de presuntos fatiados. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, 2007.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiology*, v. 94, 2004.

CAMPOS, C.A.; GERSCHENSON, L.N.; FLORES, S.K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, 2011.

CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D.; PADILHA, W.W.N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada á espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, 2008.

CHINKAMONTHONG, R.; KOSITCHAIYONG, A.; SOMBATSOMPOP, N. Effects of thermal and UV aging on antibacterial properties of linear low-density polyethylene and poly(vinyl chloride) films containing nano-silver colloid. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, 2012.

CHOBBA, B.I.; BEKIR, A.; MANSOUR, R.B.; DRIRA, N.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. *In vitro* Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil Cultivated from South-West Tunisia. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, 2012.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E. Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite. **Food Chemistry**, v. 139, 2013.

CRUZ, P.B.; PEREIRA, C.A.M. Avaliação da presença de antimicrobiano naturais em condimentos industrializados. **Revista Simbio-Logias**, v.3, 2010.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, 2012.

DURANGO, A. M.; SOARES, N. F. F.; ARTEAGA, M. R. Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables em la conservación de alimentos. **Biotecnología em el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 09, 2011.

ESPITIA, P.J.P.; SOARES, N.F.F.; COIMBRA, J.S.R.; ANDRADE, N.J.; CRUZ, R.S.; MEDEIROS, E.A.A. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, 2012.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, 2008.

GARCÍA, A.A.; CARRIL, E.PÉREZ-URRIA. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, 2009.

GIANA, H. E.; SILVEIRA JR, L.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis. **Journal of Fluorescence**, v. 13, 2003.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M.S; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on

Plant and Human Pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, 2009.

HAN, JH. Antimicrobial food packaging. In: Ahvenainen R (Ed.) **Novel food packaging techniques**. Washington, CRC, 2003. p. 50-70.

HOLM, E.S; SCHÄFER, A.; SKOV, T.; KOCH, A.G.; PETERSEN, M.A. Identification of chemical markers for the sensory shelf-life of saveloy. **Meat Science**, v. 90, 2012.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; CHATHA, S.A.S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P.S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, 2010.

IMRAN, M.; REVOL-JUNELLES, A.; RENÉ, N.; JAMSHIDIAN, M.; AKHTAR, M.J.; ARAB-TEHRANY, E.; JACQUOT, M.; DESOBRY, S. Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. **Food Hydrocolloids**, v. 29, 2012.

IRKIN, R.; ABAY, S.; AYDIN, F. Inhibitory Effects of Some Plant Essential Oils Against *Arcobacter butzleri* and Potential for Rosemary Oil as a Natural Food Preservative. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, 2011.

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, I. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, 2012.

JANJAROEN, D.; LING, F.; MONROY, G.; DERLON, N.; MOGENROTH, E.; BOPPART, S. A.; LIU, W.; NGUYEN, T. H. Roles of ionic strength and biofilm roughness on adhesion kinetics of *Escherichia coli* onto groundwater biofilm grow on PVC surfaces. **Water Research**, v. 47, 2013.

JENA, S.; DAS, H. Shelf life prediction of aluminum foil laminated polyethylene packed vacuum dried coconut milk powder. **Journal of Food Engineering**, v. 108, 2012.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.; ZU, Y.; LIU, X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, 2011.

JORDÁN, M.J.; LAX, V.; ROTA, M.C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J.A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Control**, v. 30, 2013.

JUNEJA, V.K.; DWIVEDI, H.P.; YAN, X. Novel Natural Food Antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, 2012.

KAMEDA, T.; GRAUSE G; YOSHIOKA T. Chemical modification of flexible poly(vinyl chloride) by nucleophilic substitution. **Plastics Research Online**. Disponível <<http://www.4spepro.org/pdf/002868/002868.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

KECHICHIAN, V.; DITCHFIELD, C.; VEIGA-SANTOS, P.; TADINI, C.C. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, 2010.

KOTZEIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSI, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, v. 41, 2008.

KREYENSCHMIDT, J.; HÜBNER, A.; BEIERLE, E.; CHONSCH, L.; SCHERER, A.; PETERSEN, B. Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, 2010.

KRÜCKEN-PEREIRA, L.; ABREU, A. F.; BOLZAN, A. A necessidade de inovar: um estudo na indústria de alimentos. **Revista de Ciências da Administração**, Florianópolis, v. 04, 2002.

LIU, Q.; HAN, J.; ZHANG, Y.; LI, S.; LI, J. Antimicrobial and antioxidant activities of carboxymethyl cellulose edible films incorporated with rosemary extracts on fresh beef during refrigerated storage. **Advanced Materials Research**, v. 554-556, 2012.

LÓPEZ-RUBIO, A.; ALMENAR, E.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; LAGARRÓN, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Overview of active polymerbased packaging technologies for food applications. **Food Reviews International**, v. 20, 2004.

MACHADO, T.F.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. Fortaleza, CE: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2011.

MADALENO, E.; ROSA, D.S.; ZAWADZKI, S.F.; PEDROZO, T.H.; RAMOS, L.P. Estudo do uso de plastificantes de fontes renovável em composições de PVC. **Polímeros**, v.19, 2009.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J.M.; GARRIGA, M. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. **Food Microbiology**, v. 25, 2008.

MARZOUG, G.H.B., et al. *Eucalyptus oleosa* Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). **Molecules**, v. 16, 2011.

MELO, A.A.M.; GERALDINE, R.M.; SILVEIRA, M.F.A.; TORRES, M.C.L.; REZENDE, C.S.M.; FERNANDES, T.H.; OLIVEIRA, A.N. Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, 2012.

MOGHTADER, M.; AFZALI, D. Study of the antimicrobial properties of the essential oil of Rosemary. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 5, 2009.

MOGHTADER, M.; SALARI, H.; FARAHMAND, A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. **Journal of Ecology and the Natural Environment**, v. 3, 2011.

MOLLER, J.K.S.; PAROLARI, G.; GABBA, L.; CHRISTENSEN, J.; SKIBSTED, L.H. Monitoring Chemical Changes of Dry-Cured Parma Ham during Processing by Surface Autofluorescence Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, 2003.

MORAES, A.R.F.; VIDIGAL, M.C.T.R.; SOARES, N.F.F.; MORAES, L.P.; MELO, N.R.; GONÇALVES, M.P.J. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano aromatizado para aplicação em massa de pastel. **Ciência Rural**, v. 41, 2011.

MORAES, A.R.F.; GOUVEIA, L.E.R.; SOARES, N.F.F.; SANTOS, M.M.S.; GONÇALVES, M.P.J.C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, 2007.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, 2009.

MOUNCHID, K.; BOURJILAT, F.; DERSI, N.; BELLIK, A.; ABOUSSAOUIRA, T.; RACHIDAI, A.; TANTAQUI-ELARAKI, A.; ISMAÏLI-ALAOUI, M. Toxicity of south Morocco *Rosmarinus officinalis* essential oil: antibacterial and histopathological effects. **Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire**, v. 24, 2004.

MOURA, S.C.S.R. et al. Determinação da vida-de-prateleira de maçã-passa por testes acelerados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, 2007.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. p. 19087-1898, USA, 2003¹.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. p. 19087-1898, USA, 2003².

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. p. 19087-1898, Estados Unidos, 2002¹.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. p. 19087-1898, Estados Unidos, 2002².

NTZIMANI, A.G.; GIATRAKOU, V.I.; SAVVAIDIS, I.N. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, 2010.

OLIVEIRA, A.N.; RAMOS, A.M.; CHAVES, J.B.P.; VALENTE, M.E.R. Cinética de degradação e vida-de-prateleira de suco integral de manga. **Ciência Rural**, v. 43, 2013.

POTHAKOS, V.; SAMAPUNDO, S.; DEVLIEGHERE, F. Total mesophilic counts underestimate in many cases the contamination levels of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) in chilled-stored food products at the end of their shelf-life. **Food Microbiology**, v. 32, 2012.

PRIMO, D.C.; MENEZES, R.S.C.; SILVA, T.O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 7, 2011.

RAHMAN, S.; PARVEZ, A.K.; ISLAM, R.; KHAN, M.H. Antibacterial activity of natural spices on multiple drug resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water, Bangladesh. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, 2011.

RAMOS, A. M.; QUINTERO, A. C. F.; FARAONI, A. S.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Efeito do tipo de embalagem e do tempo de armazenamento nas qualidades físico-química e microbiológica de abacaxi desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, 2008.

RIBEIRO; D.S.; MELO, D.B.; GUIMARÃES, A.G; VELOZO, E.S.. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, 2012.

RIBEIRO, D.S.; VELOZO, E.S.; GUIMARÃES, A.G. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, 2013.

RODOLFO JR, A.; MEI, L.H.I. Mecanismos de Degradação e Estabilização Térmica do PVC. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, 2007.

SAHAR, A.; BOUBELLOUTA, T.; DUFOUR, É. Synchronous front-face fluorescence spectroscopy as promising tool for the rapid determination of spoilage bacteria on chicken breast filet. **Food Research International**, v. 44, 2011.

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

SANTOS MS; JEZLER CN; OLIVEIRA ARMF; OLIVEIRA RA; MIELKE MS; COSTA LCB. Harvest time and plant age on the content and chemical composition of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Horticultura Brasileira**, v. 30, 2012.

SANTURIO, D.F.; COSTA, M.M.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C.P.; SÁ, M.F.; DAL POZZO, M. ALVES, S.H.; FRIES, L.L.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v. 41, 2011.

SASAKI, K.; EL OMRI, A.; KONDO, S.; HAN, J.; ISODA, H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 238, 2013.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. **Acta Biomaterialia**, v.7, 2011.

SEYDIM, A.C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, 2006.

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, 2009.

SINGH, M., GULERIA, N. Influence of harvesting stage and inorganic and organic fertilizers on yield and oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, v. 42, 2013.

SIQUEIRA, E. P; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Fingerprint of volatiles from plant extracts based on SPME-GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognócia**, v. 17, 2007.

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**, n. 56, 2009.

SOARES, N.F.F.; BOLAÑOS, D.G.; DELGADO, J.E.; PACHECO, J.J.R.; ESPITIA, P.J.P.; SILVA, C.A.S.; MELO, N.R. Desenvolvimento e avaliação de filmes de base celulósica incorporados com nanocompostos e lactato de sódio para a conservação de carne bovina fresca. 3º Workshop de Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, **Embrapa Soja**, 2007.

SOARES, I.P.; REZENDE, T.F.; FORTE, I.C.P. Determination of sulfur in diesel using ATR/FTIR and multivariate calibration. **Eclética Química**, v. 35, 2010.

SOUSA, J.P.; TORRES, R.A.; AZERÊDO, G.A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; VASCONCELOS, M.A.S.; SOUZA, E.L. Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, 2012.

SOUZA, S.M.C.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, 2004.

STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z.; NEŠIĆ, M.; ČOMIĆ, L.; RADULOVIĆ, N. Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial Rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.). **Biologica Nyssana**, v. 1, 2010.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, 2010.

TRAJANO, V.N.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, 2009.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, 2005.

VÉKEY, A. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 6, 2001.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS, Y.R.; ZAPATA, E.S.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, 2010.

WOLD, J. P.; MIELNIK, M. Nondestructive assessment of lipid oxidation in minced poultry meat by autofluorescence spectroscopy. **Journal of Food Science**, v. 65, 2000.

WOLD, J. P.; MIELNIK, M.; PETTERSEN, M. K.; AABY, K.; BAARDSETH, P. Rapid assessment of rancidity in complex meat products by front face fluorescence spectroscopy. **Journal of Food Science**, v. 67, 2002.

XUE, X.; PAN, J.; XIE, H.; WANG, J.; ZHANG, S. Fluorescence detection of total count of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on water-soluble CdSe quantum dots coupled with bacteria. **Talanta**, v. 77, 2009.

YAN, Q.; ZHANG, J.; DONG, H.; HOU, H.; GUO, P. Properties and Antimicrobial Activities of Starch–Sodium Alginate Composite Films Incorporated with Sodium Dehydroacetate or Rosemary Extract. **Journal of Applied Polymer Science**, n. 127, 2013.

YOSR, Z.; HNIA, C.; RIM, T.; MOHAMED, B. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, 2013.

YU, Mi-Hee; CHOI, Jun-Hyeok; CHAE, In-Gyeong; IM, Hyo-Gwon; YANG, Seun-Ah; MORE, Kunal; LEE, In-Seon; LEE, Jinho. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, 2013.

ZAIA, D.A.M.; GUARNIERI, L.O.; SOBOTA, K.N.; SANTANA, H.; ZAIA, C.T.B.V. Desenvolvimento de um método para determinação de ácidos graxos utilizando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, 2011.

ZOGDA, J.R.; PORTER, JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, 2001.

APÊNDICE A – Tabela 3. Dados do crescimento microbiano de três repetições, doze tempos de análise e quatro concentrações. Os valores estão expressos em Log UFC/g.

(Continua)

CONC%	TEMPO	LOG	CONC%	TEMPO	LOG
0%	0h	2,5	30%	0h	1,6
0%	0h	2,9	30%	0h	2,6
0%	0h	2,7	30%	0h	2,1
0%	0,5h	1,3	30%	0,5h	2
0%	0,5h	2,9	30%	0,5h	3
0%	0,5h	2,1	30%	0,5h	2,5
0%	1h	3	30%	1h	3,8
0%	1h	2,8	30%	1h	2,9
0%	1h	2,9	30%	1h	3,35
0%	2h	3,9	30%	2h	3,1
0%	2h	2,8	30%	2h	2,5
0%	2h	3,35	30%	2h	2,8
0%	4h	2,1	30%	4h	1,1
0%	4h	2,6	30%	4h	3,2
0%	4h	2,35	30%	4h	2,15
0%	8h	3,3	30%	8h	2,4
0%	8h	2,7	30%	8h	2,7
0%	8h	3	30%	8h	2,55
0%	12h	3,7	30%	12h	1,6
0%	12h	2,7	30%	12h	3,1
0%	12h	3,2	30%	12h	2,35
0%	24h	1,8	30%	24h	1,9
0%	24h	2,7	30%	24h	2,8
0%	24h	2,25	30%	24h	2,35
0%	48h	2,3	30%	48h	2,5
0%	48h	3,6	30%	48h	3,7
0%	48h	2,95	30%	48h	3,1
0%	72h	3	30%	72h	2,6
0%	72h	4,9	30%	72h	3,7
0%	72h	3,95	30%	72h	3,15
0%	96h	4	30%	96h	3,5
0%	96h	4,2	30%	96h	4,8
0%	96h	4,1	30%	96h	4,15
0%	168h	6	30%	168h	5,8
0%	168h	5,4	30%	168h	5,3
0%	168h	5,4	30%	168h	5,3

CONC%	TEMPO	LOG	CONC%	TEMPO	LOG
40%	0h	4,6	50%	0h	2,9
40%	0h	2,4	50%	0h	2,6
40%	0h	3,5	50%	0h	2,75
40%	0,5h	2,4	50%	0,5h	2,3
40%	0,5h	3,1	50%	0,5h	2,7
40%	0,5h	2,75	50%	0,5h	2,5
40%	1h	2	50%	1h	1,5
40%	1h	2,7	50%	1h	2,9
40%	1h	2,35	50%	1h	2,2
40%	2h	2,6	50%	2h	1,1
40%	2h	2,6	50%	2h	2,5
40%	2h	2,6	50%	2h	1,8
40%	4h	0,6	50%	4h	1
40%	4h	4	50%	4h	3,8
40%	4h	2,3	50%	4h	2,4
40%	8h	1,3	50%	8h	1,7
40%	8h	2,4	50%	8h	3,3
40%	8h	1,85	50%	8h	2,5
40%	12h	1,8	50%	12h	3,9
40%	12h	2,9	50%	12h	2,5
40%	12h	2,35	50%	12h	3,2
40%	24h	1,8	50%	24h	2,9
40%	24h	2,8	50%	24h	2,6
40%	24h	2,3	50%	24h	2,75
40%	48h	2,3	50%	48h	2,3
40%	48h	3,2	50%	48h	2,2
40%	48h	2,75	50%	48h	2,25
40%	72h	2,3	50%	72h	2,9
40%	72h	3,8	50%	72h	3,6
40%	72h	3,05	50%	72h	3,25
40%	96h	2,8	50%	96h	2,3
40%	96h	4,8	50%	96h	4,5
40%	96h	3,8	50%	96h	3,4
40%	168h	5	50%	168h	5,8
40%	168h	4	50%	168h	5,4
40%	168h	4	50%	168h	5,4

ANEXO I

Laudo de análise do óleo essencial de alecrim

Vigilância Sanitária CEVS 353870901-519-000001-1-6 M.S. 1.05.983-7	CONTROLE DE QUALIDADE Laudo de Análise	 FLORIEN Distribuidor de Insumos Farmacêuticos GRUPO FLORES E ERVAS		Farmacêutica Responsável: <i>Paula M. Pezzatti</i> Dra. Paula Mariana Pezzatti CRF-SP 35044
 EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA.	Flores e Ervas Com. Farm. Ltda - EPP Estrada Vicente Bellini, 175 - Piracicaba - SP CNPJ: 00.802.210/0001-50 E-mail: floreseeervas@floreseeervas.com.br Website: www.floreseeervas.com.br Fone: (19) 3429-1199		Nota Fiscal: 6968	

INFORMAÇÕES GERAIS			
Nosso Lote : 032805	Parte utilizada : Folhas	Validade/ fornecedor: 10/2012	
Nomenclatura : ÓLEO ESS. ALECRIM	Esterilização : Não Houve	Validade/ nosso lote : 10/2012	
Nome científico : Rosmarinus officinalis	Manufatura : 10/2010	Método de secagem : ---	
Origem : Nacional	Lote de origem : EGMI081011		

ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS	
	NA

CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS		
Cor : Incolor	Odor : Característico	Sabor : Característico

CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS					
	Especificação	Resultado		Especificação	Resultado
Aspecto :	Líquido límpido		pH :		5
Elementos estranhos :	Ausente		Solubilidade :		I
Umidade :	NA		Densidade :	0,878 g/ml	I
Cinzas totais :	NA		Líquido extrator :		N
Cinzas insolúveis :	NA		Teor alcoólico :		N
Metals pesados :			Resíduo seco :		N

TESTES DE IDENTIFICAÇÃO	
	NA

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS		
Análise	Especificação	Resultado
Contagem padrão em placas :	Máx. 10.000 ufc/g	De acordo
Bolores e leveduras :	Máx. 100 ufc/g ou ml	De acordo
Contagem de enterobactérias :	Máx. 100 ufc/g ou ml	De acordo
<i>Escherichia coli</i> (coliformes) :	Ausência	De acordo
<i>Staphylococcus aureus</i> :	Ausência	De acordo
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> :	Ausência	De acordo
<i>Salmonella sp</i> :	Ausência	De acordo

TEOR DE PRINCÍPIO ATIVO		
Especificação	Resultado	Método utilizado
<small>1-Identificação por colorimetria 2-Espectrometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros</small>		

CONCLUSÃO DA ANÁLISE APROVADO	DATA DA ANÁLISE 24/11/2010	DATA DA IMPRESSÃO 4/4/2011
---	--------------------------------------	--------------------------------------

OBS	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ESPECIFICAÇÃO: 1227 CT () CP (X) NC () <i>R. O. S. L. L.</i> <small>Camilla Alagon</small>	DADOS ANALISADOS FORNECEDOR • Características físicas (X) OK () Incoforme • Solubilidade (X) OK () Incoforme • PH (X) OK () Incoforme • Ponto Fusão NA () OK () Incoforme • Perda Dessecação e Água (X) OK () Incoforme
--	---

Anexo II

Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001

Tabela 4. Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
5 CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS						
i)	Coliformes a 45°C/g	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros);						
produtos a base de sangue e derivados, processados						
	Estaf.coag.positiva/g	3x10 ³	5	1	10 ²	3x10 ³
	C. sulfito redutor a 46°C	5x10 ²	5	1	10 ²	5x10 ²
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

* Para fins de aplicação de plano de amostragem entende-se:

m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável;

M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis;

n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo);

c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classe