

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REVESTIMENTOS
NATURAIS NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA
RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO**

HENRIQUE CEZAR ALVES

São Carlos

2015

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REVESTIMENTOS NATURAIS NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia –Universidade
Federal de São Carlos, para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

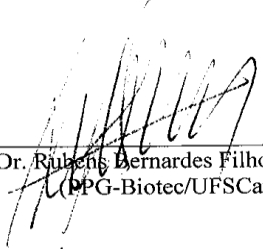
FOLHA DE APROVAÇÃO
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REVESTIMENTOS NATURAIS NA
CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E
EMBALADA A VÁCUO

HENRIQUE CEZAR ALVES

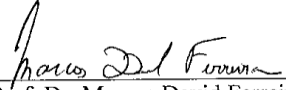
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 30/10/2015

BANCA EXAMINADORA



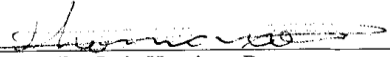
Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho - Orientador
(PPG-Biotec/UFSCar)



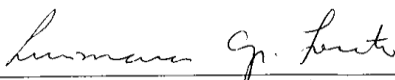
Prof. Dr. Marcos David Ferreira
(EMBRAPA)



Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt
(UNICAMP)



Dr. Luis Henrique Romano
(UFSCar)



Profa. Dra. Lucimara Aparecida Forato
(EMBRAPA)

“Se não fossem as gotas d'água, a fonte não existiria.”

Francisco Cândido Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã, meu sobrinho/afilhado, Lorenzo, minha namorada, aos meus avós, tios, primos e amigos, que sempre estiveram comigo, nos bons e maus momentos. Dedico também, em especial, ao meu querido tio e padrinho, Florisvaldo Geminiano Joaquim, uma das pessoas de melhor caráter e mais generosas que eu tive o prazer de conviver. Aonde quer que ele esteja, tenho certeza que está feliz por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus pais, Lauro e Marielza, por terem me concedido a vida.

Aos meus orientadores, prof. Dr. Rubens Bernardes Filho e profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, pelo auxílio, confiança e apoio na execução deste trabalho.

À minha irmã, Daniela, todos os familiares, amigos e colegas, que sempre me apoiaram para que este trabalho fosse possível.

À minha namorada, Amanda, mesmo tendo entrado recentemente na minha vida, pela compreensão, me dando todo o apoio e incentivo incondicionais, na etapa final deste trabalho.

À Dra. Rejane Goy e ao Dr. Humberto Brandão, por me ensinarem a preparar o extrato e as nanopartículas de própolis.

À toda a equipe da Embrapa Instrumentação, em especial à Silviane, Joana, Viviane, Adriana, Edilson Gabriel, Alice, Marcelo e Luiz Mattêo, por todo o suporte e ajuda.

Aos profs. Drs. José Teixeira, António Vicente e à Dra. Joana Martins pela co-orientação, durante o estágio doutoral realizado na Universidade do Minho – Portugal.

A todos os colegas do Laboratório de Indústria e Processo – LIP, da Universidade do Minho, por todo o auxílio e companheirismo.

À Dra. Renata Nassu, ao Dr. Rymer Tullio e ao Dr. Avelardo Ferreira, da Embrapa Pecuária Sudeste, pelas técnicas que me ensinaram e que foram fundamentais na realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Pedro de Souza e ao Rodrigo Souza (Roko), da FCAV/Unesp de Jaboticabal, pelo auxílio nas análises de oxidação lipídica (TBARS).

À Milene Foschini, pela ajuda com as análises estatísticas.

À CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche concedidas.

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de carne bovina *in natura*, o que em 2014 representou cerca de US\$23,31 bilhões em Valor Bruto da Produção (VBP) em um mercado de US\$62,97 bilhões por ano, gerando cerca de 7 milhões de empregos. Os parâmetros mais avaliados em carne, podem ser subdivididos em físico-químicos como temperatura (T), atividade de água (Aw), potencial redox (Eh), potencial hidrogeniônico (pH), maturação ou tenderização, método de cocção e sensoriais como coloração, maciez, textura, suculência e *flavour* - combinação entre aroma e sabor. Como 75% da composição muscular é água, na conversão de músculo em carne há uma liberação de 2% a 5% dessa água total, devido à evaporação e exsudação, caracterizando uma elevada Aw. Esta solução obtida é rica em aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, açúcares e apesar de embalagem a vácuo ser considerada eficiente, na conservação de carne bovina *in natura* resfriada, um grave problema, conhecido como *blown pack* ou tufamento de embalagem, pode ocorrer caso a contaminação microbiológica seja significativa ou não se respeite a temperatura mínima de resfriamento (4 ± 2 °C). Portanto, a redução da proliferação microbiana em carne é necessária. Com este intuito, foi utilizado neste trabalho um revestimento a base de quitosana a 1% (m/m) e glicerol a 0,5% (m/m) que pode ser aplicado para a proteção de alimentos, especialmente como filmes e revestimentos comestíveis. Paralelamente, foram avaliados os efeitos de extrato (EEP) e nanopartículas de própolis (NPs), frente a alguns gêneros bacterianos comumente encontrados em carne fresca *in natura*. A permeabilidade do filme, produzido, respectivamente aos gases O₂ e CO₂ foi de $1,53 \pm 0,73 \cdot 10^{-15} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$ e de $1,20 \pm 0,06 \cdot 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$, comparativamente maior, em relação aos trabalhos citados. Esse filme possui alto teor de umidade e baixa solubilidade relativos, o que é interessante para aplicação em carne, pois mantém sua propriedade de barreira e integridade, mesmo sob elevada umidade e possível atividade de água. Com relação à coloração (Hue) das amostras de contrafilé (*Longissimus dorsi*) utilizadas nestes experimentos, no 7º dia houve uma pequena desvantagem para as amostras revestidas e a vácuo em relação às que não estavam a vácuo. Porém, no 14º dia o brilho (Croma) das amostras nesta mesma condição foi superior ao das outras amostras e não houve diferença significativa na cor. Portanto, esta condição ainda pode ser considerada mais vantajosa, quando se deseja estender o tempo de prateleira. O revestimento em questão, melhorou a capacidade de retenção de água (CRA) de amostras de carne, o que auxilia na desejada suculência do produto. Além disso, inibiu o crescimento de enterobactérias, bactérias ácido-láticas (BALs) e psicrotróficas totais, o que certamente poderá aumentar o tempo de prateleira de carne *in natura*. O EEP utilizado possui teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante relativamente elevados. Para todas as concentrações de EEP e NPs testadas, com todas as espécies bacterianas, obteve-se resultados melhores com as NPs.

Palavras-chave: quitosana, revestimento comestível, qualidade, tempo de prateleira, própolis

NATURAL COATINGS EFFECT ASSESSMENT ON PRESERVATION OF MATURED BEEF

ABSTRACT

Brazil is the second largest producer and exporter of bovine fresh meat, what in 2014 accounted for about US\$23.31 billion in Gross Value of Production (GVP) in a market of US\$62.97 billion per year, generating about 7 million jobs. The most evaluated parameters about meat, can be divided into physical-chemical like temperature, water activity (A_w), redox potential (E_h), hydrogen ion potential (pH), maturation or tenderization, cooking method and sensorial like color, softness, texture, juiciness and flavor - combination of aroma and taste. As 75% of muscle composition is water, in the muscle conversion into meat there is an amount of water release due evaporation and exudation, the amount is about 2% to 5% of the total water, which are rich in amino acids, peptides, nucleotides and sugars, which features a high water activity, a term created to describe the free and available water in food for the growth of micro-organisms and occurring spoilage reactions. Although the vacuum packaging is an efficient way to conserve chilled beef, a serious problem, known as blown pack may occur if microbial contamination is significant or not respect the cooling minimum temperature (4 ± 2 ° C). Therefore, the reduction of microbial proliferation in food is necessary, because this practice ensure increased shelf life, the food security, and maintaining the product appearance. In this work, we used a coating based on chitosan which has the potential to be applied to food protection, especially as edible films and coatings. The permeability of the film produced in this work to O_2 and CO_2 gases is relatively larger, compared to the works cited. The film developed in this work has relatively high moisture content and low solubility, what is interesting for application in meat, because it keeps its barrier property and integrity, even under high humidity and possible high water activity. Regarding the color (Hue) samples, on the 7th day there was a small disadvantage of coated samples and vacuum relative to that were not vacuum. However, on the 14th day, brightness (Chroma) of the samples in this condition was better than the other samples and, there was no significant difference in color. Therefore, this condition can still be considered more advantageous when we wish to extend the shelf life time. The film developed in this work, improved water holding capacity (WHC) of meat samples, which helps the desired juiciness of the product. The edible film of chitosan base selected for application to fresh meat, inhibits the growth of enterobacteria, lactic acid bacteria (LABs) and total psychrotrophic, which certainly can increase the shelf life of the product.

Keywords: chitosan, edible coating, quality, shelf life, propolis.

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1 Médias das tensões superficiais das soluções dos filmes de quitosana	32
Tabela – 2 Médias dos coeficientes de adesão de cada formulação de gel de quitosana	32
Tabela – 3 Médias dos coeficientes de coesão de cada formulação de gel de quitosana.....	32
Tabela - 4 Médias dos coeficientes de espalhamento de cada formulação de gel de quitosana	33
Tabela - 5 Resultados da ANOVA para avaliação dos efeitos dos reagentes no We dos filmes ao nível de significância de 5%...	33
Tabela 6 – Médias e desvios-padrão (dp) dos valores de pH obtidos a partir do 7º dia de experimento.....	40
Tabela 7 - Médias e desvios-padrão (dp) de ângulos de Hue...	44
Tabela 8 - Médias e desvios-padrão (dp) de croma.....	45
Tabela 9 - Médias e desvios-padrão (dp) de CRA.....	47
Tabela 10 - Médias e desvios-padrão de TBARS.....	49
Tabela 11 - Médias e desvios-padrão de todos os bioensaios...	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização (Assis e Alves, 2002)...	18
Figura 2 - Esquema representativo das tensões interfaciais existentes num sistema trifásico, em que duas das fases estão condensadas..	19
Figura 3 – Frasco para ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.....	23
Figura 4 – Dessecador com ventoinhas, para circulação de ar durante a realização de ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.....	24
Figura 5 – Câmara para determinação de permeabilidade gasosa em filmes.....	25
Figura 6 - Representações do sólido das cores pelo método CIE $L^*a^*b^*$ no espaço das cores. Imagem de Konica Minolta Sensing Americas.....	28
Figura 7 – Imagem 2D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.....	37
Figura 8 – Imagem 3D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.....	38
Figura 9 - Amostra de carne, embalada a vácuo e não revestida, no 21º dia de experimento	43
Figura 10 - Amostra de carne, embalada sem vácuo e revestida, no 21º dia de experimento.....	43
Figura 11 - Amostra de carne, embalada a vácuo e revestida, no 21º dia de experimento.....	44
Figura 12 – Placas de Petri contendo meio MacConkey com crescimento de enterobactérias (A) e sem crescimento (B).....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de Pareto indicando influência positiva para as variáveis, ou interações delas, cujas barras ultrapassam a linha vermelha tracejada.....	34
Gráfico 2 - Médias e desvios-padrão do We.....	34
Gráfico 3 – Médias e desvios-padrão do pH.....	39
Gráfico 4 - Médias e desvios-padrão (dp) de ângulo de Hue.....	41
Gráfico 5 - Médias e desvios-padrão de croma.....	42
Gráfico 6 - Médias e desvios-padrão de CRA.....	46
Gráfico 7 - Médias e desvios-padrão de TBARS.....	48
Gráfico 8 - Médias e desvios-padrão em UFC.mL ⁻¹ para Enterobactérias totais.....	50
Gráfico 9 - Médias e desvios-padrão em UFC.mL ⁻¹ para BALs totais.....	52
Gráfico 10 - Médias e desvios-padrão em UFC.mL ⁻¹ para Psicotróficas totais.....	53

LISTA DE SIGLAS

AMC – ágar MacConkey

AMRS – ágar DeMan, Rogosa e Sharpe

ASB – ágar sangue base

ANOVA – Análise de variância

BALs – bactérias ácido-láticas

CIE - Comissão Internacional de Iluminação

CRA – capacidade de retenção de água

Dp – desvio-padrão

EDL - Espalhamento Dinâmico de Luz

EEP - extrato etanólico de própolis

MFA – microscopia de força atômica

MIC - concentração inibitória mínima

NPs - nanopartículas de própolis

NVNR – amostra de carne embalada sem vácuo e sem revestimento

NVRE – amostra de carne embalada sem vácuo e com revestimento

TBARS – análise de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

UFC – unidades formadoras de colônia

VANR – amostra de carne embalada a vácuo e sem revestimento

VARE - amostra de carne embalada a vácuo e com revestimento

LISTA DE SÍMBOLOS

a^* - coordenada vermelho/verde (+a indica vermelho e -a indica verde)

b^* - coordenada amarelo/azul (+b indica amarelo e -b indica azul)

ΔP – pressão diferencial

γ_L^d - interação dispersiva de um líquido puro

γ_L^V - tensão superficial na interface líquido/vapor

γ_s^d – interação dispersiva na superfície de um sólido

γ_s^p - interação polar na superfície de um sólido

γ_s^V - tensão superficial na interface sólido/vapor

L^* - Luminosidade

PCO_2 – permeabilidade ao gás carbônico

PO_2 – permeabilidade ao gás oxigênio

W_a – coeficiente de adesão

W_c – coeficiente de coesão

W_e – coeficiente de espalhamento

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	21
3. Material e Métodos	21
3.1 Caracterização da superfície da carne	21
3.2 Determinação de tensão superficial das soluções de filmes de quitosana	22
3.3 Estudo das formulações de filme de quitosana	22
3.4 Determinação de permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água... ..	23
3.5 Determinação de permeabilidade, do filme selecionado, aos gases O₂ e CO₂.....	24
3.6 Determinação da espessura e das propriedades mecânicas de um filme de quitosana.....	26
3.7 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado.....	26
3.8 Caracterização de superfície, do filme selecionado, por microscopia de força atômica (MFA).....	27
3.9 Determinação do pH de amostras de carne.....	27
3.11 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA).....	29
3.12 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS).....	29
3.13 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>, bactérias ácido-lácticas (BALs) e psicrotróficas totais em amostras de carne.....	30
3.14 Análises estatísticas.....	31

4. Resultados e discussão.....	31
4.1 Caracterização da superfície da carne	31
4.2 Determinação de tensão superficial das soluções de filmes e da melhor formulação do filme de quitosana.....	31
4.3 Determinação de permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água.....	35
4.4 Determinação de permeabilidade, do filme selecionado, aos gases O₂ e CO₂	35
4.5 Determinação de espessura e de propriedades mecânicas de um filme de quitosana.....	36
4.6 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado.....	36
4.7 Caracterização de superfície, do filme selecionado, por microscopia de força atômica (MFA).....	37
4.8 Determinação do pH de amostras de carne.....	38
4.9 Avaliação colorimétrica.....	40
4.10 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA).....	45
4.11 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS).....	47
4.12 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>, bactérias ácido-lácticas (BALs) e psicrotróficas totais em amostras de carne.....	49
5. Conclusões.....	54
6. Referências.....	55
7. ANEXOS	
7.1. Normas ASTM	

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REVESTIMENTO COMESTÍVEL NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de carne bovina *in natura* e de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture – USDA*, 2015), a produção brasileira deste produto, em 2014, foi de 9,723 milhões de toneladas (em equivalente carcaça), somente inferior à norte-americana, que é de 11,078 milhões de toneladas. Ainda de acordo com o USDA, em 2014 o Brasil exportou 1,909 milhões de toneladas, em equivalente carcaça, quantidade apenas inferior às 2,082 milhões de toneladas exportadas pela Índia. Portanto, a pecuária de corte no Brasil é um dos principais pilares do agronegócio brasileiro. Em 2014, o Valor Bruto da Produção (VBP) de carne foi de pouco mais de US\$23,31 bilhões, atrás apenas da produção de soja (BRASIL, 2015). A cadeia produtiva da carne movimentou US\$62,97 bilhões por ano, gerando aproximadamente 7 milhões de empregos (NEVES, 2012).

Em 2012, o Brasil exportou carne bovina para 142 países (BRASIL, 2013). Esse avanço, em grande parte, só foi possível devido a algumas conquistas obtidas, como as zonas livres de febre aftosa e a criação em 2002, do Sistema Brasileiro de Identificação de Origem de Bovinos e Bubalinos – SISBOV, com intuito de garantir a procedência e a tipificação das carnes bovina e bubalina, através da rastreabilidade (BRANDÃO, 2007).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, no ano de 2015, a expectativa é que a produção de carne bovina aumente a uma taxa de 2,1% ao ano e sendo assim, até 2025, a produção nacional de carne bovina será de 11,355 milhões de toneladas, um aumento de

23,3% no período. Com relação às exportações, a projeção é que aumentem de 2015 para 2025 a uma taxa de 3,3% ao ano, chegando ao total estimado de 2,883 milhões de toneladas, ou seja, um aumento esperado de 37,4% no período em questão.

O grande sucesso de toda essa cadeia produtiva está ligado à qualidade do produto, sobre a qual devem ser considerados os aspectos *ante mortem* e *post mortem*, sendo que os cuidados devem ter início durante a vida do animal, desde o manejo, controle da alimentação até os cuidados sanitários e o meio de transporte até o abatedouro (DELAZARI, 1977). Os aspectos *ante mortem* se restringem basicamente: à genética, ao sistema de criação (confinado ou extensivo), à alimentação, à idade ou à maturidade e estresse pré-abate.

O estresse pré-abate, no transporte de bovinos até o abatedouro, em geral, ocorre devido ao espaço para os animais ser insuficiente, o que gera um gasto adicional de energia, impactando a concentração do glicogênio muscular que pode ser parcial ou totalmente esgotada (FERGUSON *et al.* 2008). Por exemplo, de acordo com Andrade *et al.* (2009), nas propriedades mais distantes e de difícil acesso, do Pantanal sul-mato-grossense, ainda predomina o transporte por comitiva até os centros de embarque fluvial ou rodoviário. Desta forma, os animais chegam ao abatedouro fadigados, famintos e estressados.

Os aspectos *post mortem* podem ser didaticamente subdivididos em físico-químicos e sensoriais, sendo que, dentre os físico-químicos, se encontram: resfriamento, estimulação elétrica, atividade de água (Aw), potencial redox (Eh), potencial hidrogeniônico (pH), maturação ou tenderização e método de cocção (FELÍCIO, 1997). Os sensoriais são: coloração, maciez, textura, suculência e flavor - combinação entre aroma e sabor (SARAIVA, 2008).

Após o abate do animal, seus músculos, tecidos e células passam por um complexo sistema de transformações conhecidas como *rigor-mortis*, no qual podem ser observadas mudanças físicas, bioquímicas e microbiológicas (FEITOSA, 1999). Em suma, o que ocorre é que os filamentos proteicos de actina e miosina, presentes no músculo, devido à ausência de adenosina

trifosfato (ATP), se unem para formar cadeias rígidas de actomiosina, caracterizando o *rigor-mortis* (ERDÖS, 1943; BATE-SMITH E BENDALL, 1947, 1949). Estas alterações fazem parte do processo conhecido como conversão dos músculos em carne.

Na conversão de músculo em carne, segundo Lawrie (1974, 1985), pelo fato de 75% da sua composição ser água, ocorre uma liberação, por evaporação e exsudação, em torno de 2% a 5% desta água, juntamente com aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e açúcares, o que caracteriza uma elevada A_w , termo criado para descrever a água livre e disponível nos alimentos, para o crescimento de micro-organismos e para que ocorram reações deteriorantes (DITCHFIELD, 2000).

Além da A_w , outros fatores que influenciam significativamente na qualidade da carne são o potencial redox (Eh) e o potencial hidrogeniônico (pH). O Eh de um alimento está relacionado com a sua composição química e com a tensão ou pressão parcial do oxigênio, durante o armazenamento (MOSSEL, 1994; OBBINGER, 1973; URBAIN, 1976). O efeito do Eh, sobre o crescimento microbiano, é o de prolongar a fase *lag* inicial (BARNES E INGRAM, 1956), ou seja, o período de adaptação ou readaptação, dos micro-organismos, às condições em que se encontra o substrato onde irão atuar, como por exemplo, a carne.

O pH *post mortem* de qualquer carne é determinado pela quantidade de ácido láctico, que é produzido a partir de glicogênio, durante a glicólise anaeróbica que ocorre nas células musculares, principalmente, pela ação de bactérias ácido-láticas. Esta produção de ácido láctico é capaz de fazer baixar o pH original do músculo, que era em torno de 7, para aproximadamente 5,5, por volta da vigésima quarta hora *post mortem* (FELÍCIO, 1997).

Este processo, essencial para amaciar e conservar o produto, pode não ocorrer caso, anteriormente ao abate, o animal sofra fadigas musculares, inanição ou estresse (LAWRIE, 2005) pois estes fatores acarretam, conseqüentemente, no esgotamento de glicogênio. Este tipo de situação ocorre principalmente devido ao transporte inadequado e com isso o estabelecimento do *rigor mortis* se dá na primeira hora pós-abate, mesmo antes de a carcaça ser levada a uma câmara fria. Isto ocorre porque a reserva energética não é

suficiente, para sustentar os metabolismos anaeróbios *post mortem* muscular e microbiano, que produzem ácido láctico.

O pH também está intimamente ligado ao processo denominado maturação, que ocorre durante a estocagem refrigerada em embalagem a vácuo, consiste na proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas (ALVES, 2005) pela já citada formação de ácido láctico, decorrente da degradação do glicogênio que provoca a queda do pH de 7,3 para aproximadamente 5,5 no espaço extracelular. Esse fato diminui a dissociação de eletrólitos fracos, aumenta a permeabilidade das membranas celulares, facilitando a difusão de enzimas citoplasmáticas, diminuindo a coesão das miofibrilas com ruptura de organelas intracelulares, principalmente os lisossomos e o retículo endoplasmático (PUGA *et. al*, 1999). A consequência dessas modificações bioquímicas é a diminuição da coesão entre as miofibrilas e o aumento da maciez.

A maturação de cortes, embalados a vácuo, deve ocorrer em câmaras frigoríficas, com temperatura ambiente entre 2 e 0 °C, pelo período de 7 a 21 dias, pois Field *et al.* (1971) comprovou que nestas condições e por este período não há alteração no *flavor*, o que está de acordo com o conceito de processamento mínimo.

Um alimento é considerado minimamente processado, desde que sejam usadas apenas técnicas que o preservem e também mantenham a sua qualidade nutricional, além das suas características sensoriais, reduzindo desta forma a dependência do calor como principal ação conservadora (Fellows, 2000). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, processamento mínimo significa manipular um produto sem alterá-lo fundamentalmente e sem adicionar ingredientes artificiais (USDA, 2015)

O processamento mínimo pode, portanto, ser visto no contexto da preocupação tradicional de processamento de alimentos para prolongar a vida de prateleira dos alimentos. Ao mesmo tempo, enquanto valorizam a conveniência que o aumento da vida útil pode trazer, os consumidores tornaram-se mais críticos com o uso de aditivos sintéticos para preservar alimentos ou melhorar características como cor e sabor (Bruhn, 2000).

Em embalagens com atmosfera modificada, normalmente são utilizadas misturas de oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e nitrogênio (N₂). Cada gás desempenha um papel específico na extensão da vida útil da carne e na manutenção de sua aparência: CO₂, inibição do crescimento de bactérias aeróbicas deteriorantes e seleção de bactérias lácticas, O₂, manutenção das características de cor da carne e N₂, inertização (GILL, 1996; SØRHEIM *et al.*, 1999).

A limitada quantidade de oxigênio e a baixa temperatura de resfriamento, no empacotamento a vácuo de carne, geralmente o tornam muito estável, pois, inibe o crescimento bacteriano indesejável, haja vista que, nestas condições, as bactérias lácticas são, normalmente, as únicas a aumentarem sua população, chegando à ordem de 10⁷ UFCs (Unidades Formadoras de Colônia).cm⁻² (GILL E NEWTON, 1978) e inibem o crescimento dos demais micro-organismos. Segundo Venturini (2009), o sistema de embalagem a vácuo, também denominado anóxico, comparado aos demais, é o que confere maior vida útil à carne mantida à temperatura em torno de 2 °C.

Apesar da embalagem a vácuo ser considerada eficiente na conservação de carne bovina resfriada, um grave problema, conhecido como *blown pack* ou tufamento de embalagem, pode ocorrer caso a contaminação microbiológica seja significativa ou não se respeite a temperatura mínima de resfriamento (4 ± 2 °C). De acordo com Jay (2005) a deterioração de carnes sob baixas temperaturas é seguida da produção de compostos sem coloração como amônia, H₂S, indol e aminas. Entre os subprodutos metabólicos da deterioração da carne, as diaminas, cadaverina e putrecina são estudadas como indicadores da deterioração.

Uma avaliação de deterioração do tipo *blown pack*, de carnes embaladas a vácuo e refrigeradas, realizada por Brightwell *et al.* (2007), demonstrou números de moderados a elevados de enterobactérias na microbiota deteriorante dessas carnes. As análises, desenvolvidas por este autor, detectaram que as enterobactérias produziram gás em carne de cordeiro em condições de anaerobiose e que estes micro-organismos podem causar deterioração e tufamento da embalagem em carnes refrigeradas embaladas a vácuo. A produção de gás foi causada pela maioria das amostras de

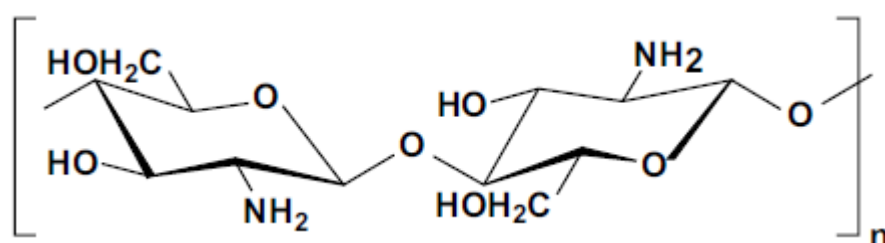
enterobactérias testadas incluindo espécies de *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* e *Rahnella*. Algumas espécies de clostrídios, principalmente *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes*, também estão implicados como agentes causadores deste tipo de deterioração (BRIGHTWELL *et al.*, 2007).

É possível observar que além dos clostrídios, outros gêneros bacterianos, como bactérias ácido-láticas e enterobactérias, por exemplo: *Lactobacillus* spp., principalmente o *L. sake* e o *L. curvatus*, *Leuconostoc gelidium*, *L. carnosum* e *L. mesenteroides* são frequentemente encontrados em carne *in natura* (BORCH *et al.*, 1996), sendo indicadas como responsáveis pela deterioração do tipo *blown pack*.

Portanto, a redução da proliferação microbiana em alimentos, por meio de revestimentos, que podem ser polímeros comestíveis, é necessária, pois esta medida garante o aumento do tempo de prateleira, a segurança alimentar, além da manutenção do aspecto do produto (GONZÁLES, 2008).

Um polímero natural, já utilizado na indústria alimentícia, é a quitosana, derivada do processo de desacetilação da quitina, que é tida como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades de beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose, conforme expressa na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização



Fonte: ASSIS E ALVES, 2002.

A quitosana tem também o potencial de ser aplicada para a proteção de alimentos, especialmente como filmes e revestimentos comestíveis

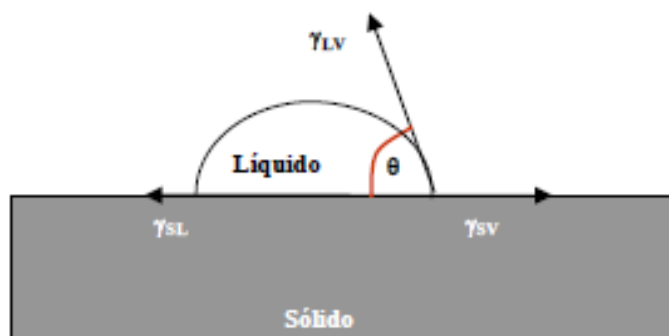
(CASARIEGO *et al.*, 2008; CERQUEIRA *et al.*, 2009). As propriedades policatiônicas da quitosana fornecem a este polímero a possibilidade de formação de filmes, pela quebra dos segmentos poliméricos e subsequente reformação da cadeia de polímero em uma matriz, de película ou gel.

As formulações de revestimentos comestíveis deverão molhar e espalhar-se uniformemente na superfície do alimento. Após secagem, os revestimentos deverão ter uma adesão, coesão e durabilidade adequada (KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997).

As determinações das tensões superficial e superficial crítica de carne, significam caracterizar a superfície exposta da mesma. De acordo com Zisman (1964), em sistemas tendo tensão superficial menor que 100 mN.m^{-1} (superfícies de baixa energia), o ângulo de contato formado por uma gota de líquido, em uma superfície sólida, pode ser usado para cálculo da tensão superficial do líquido γ_L^V (onde a fase V é ar saturado com vapor do líquido, L), que permite a aplicação do método, desenvolvido por este autor, para determinar a capacidade molhante ou molhabilidade.

Uma das características primárias de um sistema bi ou trifásico, contendo duas fases condensadas, em que pelo menos uma delas é um líquido, é o ângulo de contato do líquido na outra fase condensada (θ). O ângulo de contato da gota de líquido, na superfície sólida, é definido pelo equilíbrio mecânico da gota sob a ação de três tensões interfaciais: sólido-vapor (γ_S^V), sólido-líquido (γ_S^L) e líquido-vapor (γ_L^V), conforme pode ser observado na figura 2.

Figura 2 - Esquema representativo das tensões interfaciais existentes num sistema trifásico, em que duas das fases estão condensadas.



Fonte: Arquivo pessoal.

A capacidade molhante ou molhabilidade de um sólido por um líquido é determinada pelo balanço entre as forças adesivas (coeficiente de adesão, W_a , equação 1) do líquido no sólido e as forças coesivas (coeficiente de coesão, W_c , equação 2) do líquido. Enquanto que as forças adesivas fazem com que o líquido se espalhe sobre a superfície sólida, as forças coesivas fazem com que o líquido se contraia.

$$W_a = \gamma_L^V + \gamma_S^V - \gamma_S^L \quad (1)$$

$$W_c = 2 \cdot \gamma_L^V \quad (2)$$

Quando um sólido entra em contato com um líquido, na presença de vapor, o líquido irá aderir bem à superfície do sólido se a energia livre necessária para a criação de uma nova interface diminuir, isto é, o trabalho necessário para separar o sólido e o líquido da interface sólido-líquido tem que diminuir. O coeficiente de espalhamento (W_e), equação 3, no equilíbrio é definido pela equação 1; para que o espalhamento ocorra espontaneamente, a energia livre do processo (ΔG) terá que ser inferior a zero.

$$W_e = W_a - W_c = \gamma_S^V - \gamma_L^V - \gamma_S^L \quad (3)$$

Para um líquido puro, se as interações polar (γ_L^p) e dispersiva (γ_L^d) são conhecidas, e se θ é o ângulo de contato entre o líquido e o sólido, a interação pode ser descrita em termos de trabalho reversível de adesão, W_a , como:

$$W_a = W_a^d + W_a^p \Leftrightarrow W_a = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^d} \cdot \sqrt{\gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p} \cdot \sqrt{\gamma_L^p}) \quad (4)$$

Onde γ_S^p e γ_S^d são as contribuições polar e dispersiva da superfície do sólido estudado. Rearranjando a equação 4 acima, temos:

$$\frac{1+\cos\theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad (5)$$

Além dos revestimentos comestíveis, a utilização de antibióticos naturais, para a conservação de alimentos, torna-se cada vez mais desejada, haja vista que o consumidor moderno tende a exigir um alimento que preserve ao máximo as suas características originais e isento de produtos sintéticos, para que se atinja este objetivo (Vaithiyathan *et al.*, 2011; Economou *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2009; Chouliara *et al.*, 2007).

Um produto com tais características é a própolis, uma substância natural e resinosa, coletada em botões florais de diferentes espécies de árvores por abelhas, para a assepsia de suas colmeias, conhecida milenarmente por suas propriedades antimicrobiana e antioxidante (Koo, 2000).

A própolis ganhou popularidade como uma medicina alternativa ou alimento para a saúde e prevenção de doenças em várias partes do mundo, incluindo os Estados Unidos, a União Europeia e o Japão (Teixeira, *et al.*, 2005). A própolis verde, também conhecida como a própolis brasileira, é derivada principalmente ou exclusivamente de plantas de alecrim (*Baccharis dracunculifolia*) (Teixeira *et al.*, 2005).

Em termos de composição, é geralmente constituída por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias que incluem minerais e compostos orgânicos como ácidos fenólicos aromáticos (por exemplo: ácido cinâmico e ácido caféico) ou seus ésteres, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonóis e di-hidroflavonóis chalconas), terpenos, aldeídos, álcoois aromáticos, ácidos graxos, estilbenos e β -esteroides (Lima *et al.*, 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Flavonóide é um dos principais grupos de compostos ativos na própolis, portanto, o conteúdo de flavonóides é frequentemente utilizado para avaliar a qualidade da mesma (Brasil, 2001; Lima *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2012).

Com o advento da nanotecnologia, possibilitou-se a utilização de quantidades reduzidas de um determinado produto, obtendo-se resultados mais satisfatórios, em virtude do aumento da superfície de contato da partícula

(aumento da relação superfície/volume). Sendo assim, uma forma de potencializar a atuação da própolis é reduzi-la à forma de nanopartículas.

A venda de carne previamente embalada, em um sistema que prolongue ao máximo a sua vida útil, preservando o seu aspecto natural, principal fator que determina a decisão de compra pelo consumidor, pode ser muito vantajosa (SARAIVA, 2008), o que não ocorre com carne congelada, cuja aceitação é menor.

Sendo assim, o intuito do presente trabalho foi desenvolver uma solução a base de quitosana, visando estender a conservação de carne *in natura* e portanto o seu tempo de prateleira, mantendo as suas principais características sensoriais e com foco na segurança alimentar.

2. OBJETIVOS

- Determinar a melhor formulação de solução filmogênica de quitosana, a ser utilizada e suas propriedades;
- Determinar semanalmente algumas variações físicas, químicas e microbiológicas de amostras de carne;
- Sintetizar e caracterizar extrato etanólico (EEP) e nanopartículas de própolis (NPs);
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC), do EEP e das NPs às bactérias, pertencentes a gêneros comumente encontrados em carne:

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação da tensão superficial da carne

Carne bovina, proveniente do músculo *longissimus dorsi*, foi cortada em pequenas tiras, com as mesmas dimensões (1 X 5 cm no sentido das fibras musculares). Essas tiras foram colocadas, uma de cada vez, sobre placas de vidro e acopladas à base de um equipamento para medição de ângulos de contato (OCA 20, Dataphysics, Alemanha), conectado a um computador que contém um *software* específico, para controle e aquisição de dados. Ao mesmo equipamento, foi acoplada uma seringa de vidro, com capacidade para até 500 μL da solução desejada. Para cada líquido, foram feitas 15 repetições em 5 amostras de carne, sendo que cada gota tinha 2,0 μL .

As determinações dos ângulos de contato, das gotas de três compostos líquidos (L) puros: bromonaftaleno (Merck, Alemanha), formamida (Merck, Alemanha) e água ultrapura, na superfície da carne, combinadas com os valores da tensão dos líquidos puros utilizados, permitiram o cálculo da tensão superficial da carne.

3.2 Determinação de tensões superficiais de soluções filmogênicas de quitosana

De acordo com dados obtidos na literatura, foram escolhidas duas concentrações de quitosana (1 e 2% m/V), duas do tensoativo tween 80 (0,0 e 0,2% m/V) e duas do agente plastificante glicerol (0,5 e 1,5% m/V). Através de um planejamento fatorial com ponto central, foram preparadas e testadas 9 diferentes formulações, com diferentes concentrações de quitosana (1,0, 1,5 e 2% m/V), tween 80 (0,0, 0,1 e 0,2% m/V) e glicerol (0,5, 1,0 e 1,5% m/V), conforme pode ser observado na tabela 1, todas elas solubilizadas em ácido láctico diluído a 1% (V/V), com auxílio de um agitador magnético, durante 12h.

Tabela - 1 Formulações das soluções filmogênicas de quitosana

% Glicerol	0,50		0,50		1,00		1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10		0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00	

As tensões superficiais das soluções filmogênicas, foram medidas com auxílio de um tensiômetro mecânico (Krüss, Alemanha). Os valores de tensões superficiais foram obtidos, através da inserção e retirada, na solução desejada, de um aro metálico específico, acoplado ao equipamento obtendo-se o valor em mN.m^{-1} .

3.3 Estudo das soluções filmogênicas de quitosana

Foram testadas as 9 mesmas formulações, do experimento anterior de caracterização, (quitosana a 1,0, 1,5 e 2% m/V, tween 80 a 0,0, 0,1 e 0,2% m/V e glicerol a 0,5, 1,0 e 1,5% m/V, solubilizados em ácido láctico diluído a 1% V/V).

A carne bovina, proveniente do músculo *longissimus dorsi*, foi novamente cortada em pequenas tiras, com as mesmas dimensões (1 x 5 cm), no sentido das fibras musculares. As tiras foram colocadas, uma de cada vez, sobre placas de vidro e acopladas à base de um equipamento para medição de ângulos de contato (OCA 20, Dataphysics, Germany), conectado a um computador que contém um *software* específico, para controle e aquisição de dados. A este mesmo equipamento, foi acoplada uma seringa de vidro, com capacidade para até 500 μL da solução desejada. Para cada formulação foram feitas 15 repetições em 5 amostras de carne, sendo que cada gota tinha 2,0 μL .

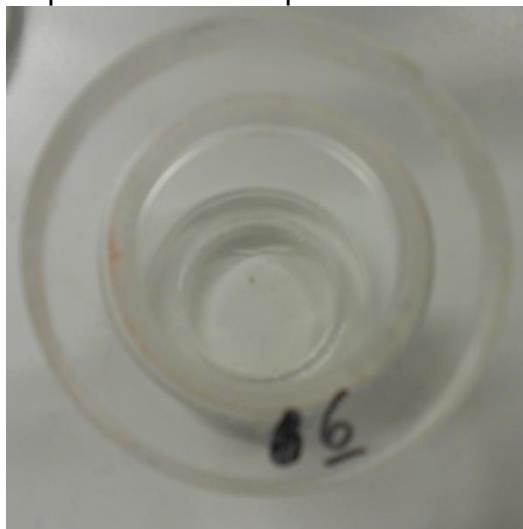
Desta forma, foram realizadas as determinações dos ângulos de contato, de cada gota e então foram calculadas as médias das 15 repetições de cada formulação. Após a obtenção das tensões superficiais, de todas formulações dos filmes, foi possível calcular os coeficientes de adesão (W_a – equação 1, página 24), coesão (W_c – equação 2 – página 24) e de espalhamento (W_e – equação 3, página 24), este último o que determina se qual(is) formulação(ões) é (são) a(s) mais adequada(s).

3.4 Determinação de permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água

Este experimento foi baseado no método ASTM-D- 3985-02 (2002). Primeiramente, a solução do filme foi preparada, de acordo com a melhor formulação determinada no experimento anterior. Em seguida, foram depositados 28 mL desta solução, em placas de Petri descartáveis de 90 mm, e deixados secar durante 12h, em estufa com circulação de ar a 30 °C, em um total de 6 réplicas.

Para a medição da permeabilidade ao vapor d'água foram usados 6 frascos de acrílico, contendo 50 mL de água destilada e uma tampa com abertura (figura 3), que permitiu prender o filme, deixando-o exposto ao ar e ao vapor d'água.

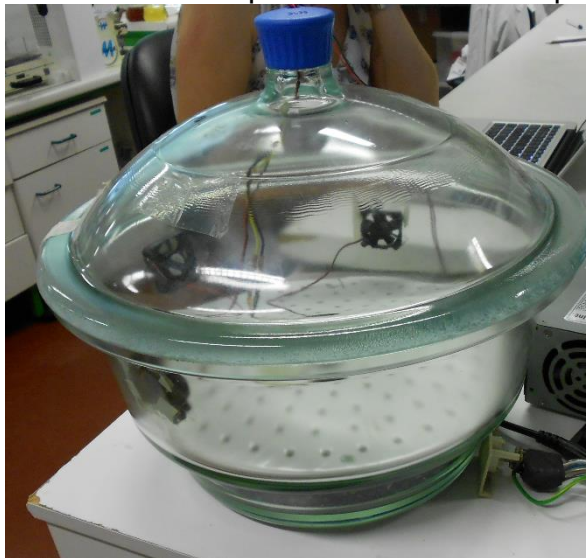
Figura 3 – Frasco para ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.



Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida, estes frascos foram colocados em um dessecador, contendo sílica desidratada e ventoinhas para facilitar as trocas gasosas (figura 4).

Figura 4 – Dessecador com ventoinhas, para circulação de ar durante a realização de ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.



Fonte: Arquivo pessoal.

Estes frascos foram pesados, já contendo a água e os filmes, depois foram colocados no dessecador. Após intervalos de 2h foram pesados novamente, para avaliação da perda d'água e consequente permeabilidade, até um total de 10h de monitoramento, quando pela literatura do método utilizado, é sabido que já ocorre uma estabilização na perda d'água.

3.5 Determinação de permeabilidade, do filme selecionado, aos gases O₂ e CO₂

A permeabilidade ao oxigênio (PO₂) e a permeabilidade dióxido de carbono (PCO₂) foram determinadas com base no método ASTM D-3985-02 (2002). Os filmes foram selados entre duas câmaras, tendo cada uma dois canais, conforme pode ser observado na figura 5.

Figura 5 – Câmara para determinação de permeabilidade gasosa em filmes.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na câmara inferior, O_2 (ou CO_2) foi fornecido a um fluxo contínuo, por meio de um controlador de fluxo gasoso (Agilent Technologies - ADM 2000, EUA), para manter a pressão constante naquele compartimento. À câmara superior, foi conectada uma fonte de N_2 gasoso, também com fluxo controlado. O N_2 agiu como um carreador para o O_2 (ou o CO_2). Para a medição da PO_2 ou (PCO_2), amostras do fluxo de saída foram coletadas em uma seringa para a quantificação destes gases.

Aos canais de saída, das duas câmaras, foram conectados manômetros, para garantir a igualdade das pressões (ambas a 1 atm) entre os dois compartimentos. À medida que o O_2 (ou o CO_2) foi carreado de forma contínua pelo fluxo de nitrogênio, foi considerado que a pressão parcial de O_2 (ou CO_2) no compartimento superior era nula. Por conseguinte, a pressão diferencial (ΔP) era igual a 1 atm. Foram testadas três réplicas do filme e obtidas três amostras para cada filme, em cada caso (PO_2 e PCO_2).

Para determinar a concentração de O_2 , 1 mL de amostra foi injetada em um cromatógrafo de fase gasosa (Chrompack 9001, Middelburg, Holanda) equipado com uma coluna Porapak Q 80/100 mesh mx 2 1/8 "x 2 mm SS, uma coluna do tipo peneira molecular e um detector de condutividade térmica TCD. Para o CO_2 , foi feito o mesmo procedimento, exceto pelo desvio da amostra,

através de uma válvula, diretamente para a coluna Porapak, sem passar pela peneira molecular. Em ambos os casos, uma mistura padrão, contendo 10% de CO₂, 20% de O₂ e 70% de N₂ foi usada para calibração.

3.6 Determinação da espessura e das propriedades mecânicas de um filme de quitosana

Os filmes foram preparados conforme descrito anteriormente, no item 3.2, da página 22. Para determinação da espessura média, foram preparados 3 filmes e cada um destes foram medidos em quatro pontos distintos, com auxílio de um micrômetro digital (Modelo 293-561, Mitutoyo, Japão). Para se determinar o alongamento máximo e a tensão necessária para romper o filme de quitosana, foram utilizadas três tiras de 2 x 5cm de três filmes distintos. Estas tiras foram acopladas a um equipamento Instron Universal Testing Machine (Modelo 4500, Instron Corporation) e os testes foram realizados seguindo as diretrizes da norma ASTM D 882-91.

3.7 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado

O teor de umidade e a solubilidade do filme selecionado foi determinado seguindo metodologia descrita por Gontard *et al.* (1994). Cadinhos foram limpos e deixados em estufa a 105 °C, 24h antes deste experimento. Após preparar o filme (triplicata), conforme descrição anterior, ele foi cortado em discos (triplicata) com 2 cm de diâmetro, que em seguida foram pesados e colocados em estufa a 105 °C, dentro dos cadinhos, previamente pesados e identificados. Após 24 h, os cadinhos contendo os filmes foram pesados novamente para determinação do teor de umidade e colocados de volta na estufa.

Para determinação da solubilidade, os mesmos filmes cortados em discos e secos foram colocados em béqueres identificados, com 50 mL de água

destilada, barras magnéticas e selados em cima com Parafilm®. Em seguida, foram deixados em agitação durante 24 h, depois filtrados em membranas de nylon, com diâmetro de poro de 100 µm. Por último, o filtrado de cada disco de filme foi colocado no respectivo cadinho e seco a 105 °C, novamente, durante mais 24 h e por fim pesados mais uma vez.

3.8 Caracterização de superfície, do filme selecionado, por microscopia de força atômica (MFA)

Foram depositados 28 mL de solução do filme selecionado, em placas de Petri descartáveis de 90 mm. Após secagem, durante 12h em estufa a 30 °C, as imagens por MFA foram obtidas mantendo as amostras nas próprias placas de Petri, utilizando-se um equipamento da marca Veeco, modelo Dimension V.

3.9 Determinação de pH de amostras de carne

Durante o período de análises (21 dias), foi feito acompanhamento semanal do pH de amostras de *L. dorsi* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR) revestimento, embaladas a vácuo (VA) ou não (NV) em PVC, sob refrigeração a $0 \pm 1^\circ\text{C}$. O revestimento foi aplicado por meio de aspersão da solução sobre as amostras de carne. Para os dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), pois sabidamente já estariam deterioradas, ou seja, em adiantado estágio de putrefação. Para este experimento, foi utilizada a metodologia descrita por Murphy *et al.* (2013). Amostras de carne (10 g) foram trituradas e posteriormente homogeneizadas (1 minuto, 24.000 rpm) em 90 mL de água ultra pura com o uso de Ultra Turrax. Em seguida foi feita a medida do pH em pH-metro de bancada.

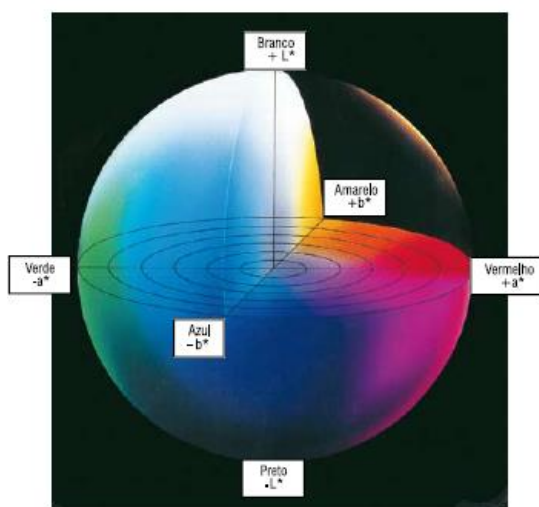
3.10 Avaliação colorimétrica

Durante o período de análises (21 dias), foi feito acompanhamento semanal da colorimetria de amostras de *L. dorsi* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem

(NR) revestimento, embaladas ou não a vácuo em PVC a $0 \pm 1^\circ\text{C}$, também com exceção nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), Utilizou-se um colorímetro Chroma Meter CR- 400/410 (Konica Minolta©) no conceito CIELAB e o espaço $L^*a^*b^*$.

O parâmetro “a*” indica a cromaticidade em um eixo verde (-) para o vermelho (+). O parâmetro “b*” indica a cromaticidade em um eixo azul (-) para o amarelo (+). O ângulo de Hue é um ângulo em uma circunferência de cor de 360° , em que os ângulos 0° , 90° , 180° , e 270° representam respectivamente as cores: vermelha, amarela, verde e azul, conforme representado na figura 6, abaixo. O croma é a intensidade de Hue.

Figura 6 - Representações do sólido das cores pelo método CIE $L^*a^*b^*$ no espaço das cores.



Fonte: Konica Minolta Sensing Americas.

Foram feitas três medidas sobre as embalagens em três pontos diferentes da carne. A partir dos valores de a^*b^* é possível obter os valores de croma e hue, por meio das equações 6 e 7 a seguir.

$$\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (6)$$

$$\text{Hue} = \tan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (7)$$

3.11 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA)

Durante o período de análises (21 dias), foi feito acompanhamento semanal da CRA de amostras de *L. dorsis* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR) revestimento, embaladas (VA) ou não (NV) a vácuo em PVC a $0 \pm 1^\circ\text{C}$ exceto nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), pois sabidamente já estariam deterioradas ou seja, em adiantado estágio de putrefação. Pesaram-se pequenas porções (triplicata) de amostras, em pedaços únicos, com massa entre 2,00 a 2,10 g. Em seguida, estas amostras foram colocadas em envelopes de papel filtro qualitativo (100 x 200 mm) e prensadas, durante 5 minutos entre duas placas de acrílico (150 x 150 x 5 mm) com um cilindro de aço de alta densidade, cuja massa é de 10,00 kg. Por fim, as amostras foram pesadas novamente e o cálculo da CRA era feito de acordo com a equação 8.

$$\text{CRA}\% = \frac{\text{Massa não prensada} - \text{Massa prensada}}{\text{Massa não prensada}} \times 100 \quad (8)$$

O resultado foi expresso como uma porcentagem do peso inicial.

3.12 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS)

Oxidação lipídica foi medida nos dias 0, 7, 14 e 21, de armazenamento de amostras de *L. dorsis* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR)

revestimento, embaladas (VA) ou não (NV) a vácuo em PVC a $0 \pm 1^\circ\text{C}$ exceto nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), pois já estariam deterioradas. Foi utilizado o ensaio de ácido 2-tiobarbitúrico como descrito por Siu e Draper (1978). Amostras de carne trituradas (5 g) foram homogeneizadas, durante 2 min em 25 mL de água destilada, usando um dispersador Ultra-Turrax® (IKA® Works, Inc. - Alemanha). Em seguida, foram adicionados 25 mL de Ácido tricloroacético (TCA – Labsynth, Brasil) a 10% e a mistura foi agitada vigorosamente e filtrada através de papel de filtro Whatman nº 1. Em um tubo de ensaio com tampa de rosca, 4 mL de filtrado límpido foram adicionados a 1 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA – Alfa Aesar®, EUA) a 0,06 M. Os tubos, então, foram colocados em água, mantida a 80°C , durante 90 min. A absorbância de 5 mL do filtrado, contendo TCA e TBA, foi medida por espectrofotometria (Cary 300 Bio, UV-Vis, Varian Instruments, EUA) a 532 nm e comparado a um “branco”, contendo todos os reagentes (2 mL de água destilada, 2 mL de TCA a 10% e 1 mL de 0,06 M de TBA). O teor de malondialdeído (MDA) das amostras foi calculado, usando um coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em mg de MDA/kg de carne.

3.13 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-lácticas (BALs) e psicotróficas totais em amostras de carne

Para esta avaliação, que também foi semanal, foram preparadas placas de Petri contendo três tipos de meios de cultura, com ágar (sólidos) MacConkey (AMC), DeMan, Rogosa e Sharpe (AMRS) e Sangue Base (ASB). Entretanto, foi utilizada a técnica *pour-plate*, na qual se injeta o inóculo com o meio ainda morno, em torno de 40°C , antes da solidificação. O inóculo foi semanalmente obtido, com uso de exsudato da carne, embalada nas diferentes condições mencionadas (amostras de *L. dorsii* com 2,5 cm de espessura, com - RE - e

sem - NR- revestimento, embaladas – VA - ou não - NV - a vácuo em PVC a $0 \pm 1^\circ\text{C}$, exceto nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas - NVNR, pois já estariam deterioradas). As embalagens foram abertas assepticamente, dentro de uma câmara de fluxo laminar e então, com auxílio de uma pipeta automática e ponteiros esterilizados, foi retirado 1 mL de exsudato de cada amostra. Em seguida, foram feitas diluições seriadas deste inóculo, sempre da ordem de 10^{-1} , em solução salina (0,9%) peptonada (0,1%). Por fim as diluições foram inoculadas nos diferentes meios e incubadas a 37°C por 24h (AMC), para o crescimento de enterobactérias totais, 30°C por 72h (AMRS) em jarras com gerador de anaerobiose (Anaerocult® Merck – Alemanha), para o crescimento de BALs totais e a 6°C por 168h (ASB) para o crescimento de psicotróficas totais. Por fim, em geral, foram consideradas as contagens entre 25 e 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC. mL^{-1} (Unidades Formadoras de Colônias).

3.14 Síntese e caracterização de extrato e nanopartículas de própolis

3.14.1 Características da própolis

Própolis verde foi obtida no sul do estado de Minas Gerais e a florada predominante foi de alecrim. Extrato etanólico de própolis (EEP) foi preparado, mediante a maceração de 12,75 g de própolis verde, em almofariz de ágata. Posteriormente, a própolis macerada foi colocada em um béquer de 250 mL, junto a 100 mL de álcool etílico absoluto, com uma barra magnética e coberto com Parafilm®. Na sequência, este béquer foi colocado em agitador magnético, a 600 rpm durante 360 h.

Para análise de fenóis totais solúveis, o procedimento de Swain e Hillis (1959) foi adaptado com poucas modificação. Três réplicas foram utilizadas para as análises. Uma alíquota de 150 μL de EEP a 0,125% (w/V) foi diluída com 2400 μL de água ultrapura, seguido pela adição de 150 μL de uma solução de Folin-Ciocalteu a 0,25 N. Na sequência, esta mistura foi incubada

durante 3 minutos no escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 300 µL de Na₂CO₃ a 1 N e a mistura foi incubada novamente no escuro durante 25 min. As absorvâncias das amostras a 725 nm foram feitas usando espectrofotômetro da marca SHIMADZU (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, EUA), modelo UV-1600. Uma amostra preparada com metanol foi utilizada como controle. O teor total de compostos fenólicos foi determinado para cada amostra, utilizando uma curva padrão (0-0,375 mg.mL⁻¹) desenvolvida com ácido gálico e expressa como mg de ácido gálico por g de extrato etanólico.

Para determinação do teor de flavonoides totais no EEP, foi utilizado o método descrito por Funari e Ferro (2006). Uma alíquota do extrato (1 mL) a uma concentração de 0,25% (m/V) de própolis, foi misturada com 1 mL de solução etanólica de AlCl₃ a 2% (m/V) e o volume foi completado até 25 mL com etanol absoluto. Após 30 minutos à temperatura ambiente e sem exposição à luz, a absorvância foi medida a 425 nm utilizando o mesmo espectrofotômetro de UV descrito experimento anterior (SHIMADZU -1600). O branco foi obtido com 1 mL de solução etanólica de AlCl₃ a 2% (m/V) e mais 24 mL de etanol absoluto. O teor de flavonoides totais foi calculado em equivalentes de quercetina (mg.g⁻¹) a partir de uma curva de calibração (concentração de 2 a 12 µg de quercetina.mL⁻¹). Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como mg de quercetina por g de extrato etanólico.

Para determinação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos, o método usado foi desenvolvido por Brand-Williams *et al.* (1995) e modificado por Sanchez-Moreno *et al.* (1998). Uma alíquota de 100 µL de EEP foi misturada com 3900 µL de 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH a 0,06M em metanol) e incubada no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram deixadas em reação durante 15 minutos, até que as condições de estado estacionário fossem alcançadas. O metanol foi utilizado como branco e medições de absorvância foram feitas a 515 nm. A capacidade antioxidante foi calculada medindo a diminuição da absorvância das amostras, em comparação com o controle (3900 µL de DPPH com 100 µL de metanol). Uma curva dose-resposta foi representada graficamente para determinar o valor de CE50. CE50 é

definida como a concentração necessária para obter 50% da capacidade máxima de oxidação. Todos os testes e análises foram realizadas em triplicata. O padrão usado no ensaio foi o Trolox (Sigma, EUA).

Para identificar alguns dos principais compostos fenólicos, foi realizada cromatografia analítica do EEP bruto, utilizando uma coluna C18 RP Agilent (2,5 X 25 mm X 5 μ m), por comparação com padrões analíticos. A fase móvel foi constituída por ácido acético / acetato de amônia / metanol / água (0,8 : 0,3 : 5,0 : 93,9% V / m / V / V) (solvente A) e acetonitrila (solvente B), definidos inicialmente na proporção de 75 : 25% (V / V), que foi linearmente mudado para 0 : 100% (V / V) durante 60 min de corrida. O eluente foi bombeado a um fluxo de 1 mL / min. Veratraldeído (Tr = 11,80 min) foi utilizado como padrão interno (IS), e foi adicionado ao solvente de extração, antes da extração. Os dados espectrais do detector de UV foram coletados após os 60 min a 280 nm. Os picos foram atribuídos de acordo com seus tempos de retenção e por coeluição com padrões analíticos, bem como baseado em espectros de UV para os padrões e amostras, sob as mesmas condições cromatográficas.

Todas as soluções padrões de ácido caféico, crisina, ácido ferúlico, campferol, ácido p-cumárico, quercetina e sakuranetina foram preparadas a 100 ppm.

3.14.2 Síntese e caracterização de nanopartículas de própolis

Cinco mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) a 0,1%, foram filtrados em membrana de *nylon* com diâmetro de poro de 0,22 μ m. Em seguida, esta solução foi aquecida a 35 °C e agitada a 600 rpm, em chapa aquecedora com agitação magnética. Posteriormente, foi adicionado por gotejamento 1 mL de EEP, preparado conforme descrição do item 3.14.1 e também filtrado no mesmo tipo de membrana, com auxílio de uma bomba de seringa, ao fluxo de 1 mL.min⁻¹, obtendo-se as nanopartículas de própolis.

O diâmetro médio de nanopartículas de própolis, em suspensão, foi determinado pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) utilizando-

se um equipamento Zetasizer Nano® da marca Malvern e por Microscopia de Força Atômica (MFA), utilizando-se um equipamento da marca Veeco, modelo Dimension V. Para o primeiro método, foi preenchida uma cubeta, específica ao equipamento, com a suspensão de nanopartículas. Posteriormente, para o segundo método, foram depositados trinta microlitros da mesma suspensão de nanopartículas, em lâmina de mica. Após secagem durante 12h em dessecador, contendo sílica desidratada, o tamanho das partículas foi obtido, por MFA.

3.15 Determinação da MIC de extrato e nanopartículas de própolis

A concentração inibitória mínima (MIC na sigla em inglês) qualitativa foi determinada para 8 espécies de bactérias, pertencentes a gêneros comumente presentes em amostras de carne, em especial, de carne embalada a vácuo. Sendo elas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thompson*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter helveticus*, *Lactobacillus buchneri* and *Leuconostoc mesenteroides*. O método utilizado foi a difusão em ágar e medição de halos inibitórios. Como o extrato era etanólico, foi feito um controle negativo (branco) somente com este solvente e no caso dos bioensaios com as NPs, também foi feito um controle somente com PVA a 0,1%.

3.16 Análises estatísticas

Para avaliar os efeitos dos reagentes no We dos filmes, foi realizado um ajuste por regressão e Análise de Variância - ANOVA. Para avaliar o efeito das diferentes condições de armazenagem sobre pH, colorimetria, CRA, oxidação lipídica e microbiologia, foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Os softwares utilizados para a realização das análises foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da superfície da carne

A tensão superficial da carne em relação à água ultrapura foi $15,65 \text{ mN.m}^{-1}$, em relação à formamida, $10,78 \text{ mN.m}^{-1}$ e em relação ao bromonaftaleno, $6,58 \text{ mN.m}^{-1}$. Conclui-se, portanto, que se trata de uma superfície de baixa energia.

4.2 Determinação da tensão superficial das soluções de filmes e da melhor formulação do filme de quitosana

Após a obtenção das tensões superficiais e dos ângulos de contato, de todas formulações dos filmes, conforme podem ser vistas as médias na tabela 1 e 2, foi possível calcular os coeficientes de adesão (W_a – equações 1,4 e 5, páginas 24 e 25), coesão (W_c – equação 2 – página 24) e de espalhamento (W_e – equação 3, página 2), sendo este último o que determina se qual(is) formulação(ões) é (são) a(s) mais adequada(s) (tabela 6).

Tabela - 2 Médias das tensões superficiais das soluções filmogênicas de quitosana

TENSÃO SUPERFICIAL (mN.m^{-1})									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
Médias	59,23	45,16	39,87	43,00	42,37	40,40	42,20	55,17	62,03

Tabela 3 - Médias dos ângulos de conato das soluções filmogênicas de quitosana

ÂNGULOS CONTATO (GRAUS)									
% Glicerol	0,5		0,5		1	1,5		1,5	
% Tween 80	0		0,2		0,1	0,2		0	
% Quitosano	1	2	1	2	1,5	1	2	1	2
Médias	27,67	50,83	37,16	47,14	56,28	36,66	50,41	30,46	52,55
Radianos	0,482874	0,887093	0,648564	0,822748	0,982271	0,639838	0,879879	0,531627	0,917112

Os resultados ≤ 0 indicam equilíbrio entre adesão e coesão. Se a adesão for maior que a coesão o filme não se mantém íntegro. De acordo com os resultados apresentados na tabela 4, as duas melhores formulações foram: quitosana a 1%, tween 80 0% e glicerol a 0,5 ou 1,5%, com W_e de -6,77 e -7,61, respectivamente.

Tabela - 4 Médias dos coeficientes de adesão de cada formulação de solução filmogênica de quitosana

W_a									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
	111,69	73,69	71,74	71,09	65,97	72,81	69,09	102,72	99,76

Tabela - 5 Médias dos coeficientes de coesão de cada formulação de de solução filmogênica de quitosana

W_c									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
	118,47	90,33	79,73	86,00	84,73	80,80	84,40	110,33	124,07

Tabela - 6 Médias dos coeficientes de espalhamento de cada formulação de de solução filmogênica de quitosana

W_e									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
	-6,77	-16,64	-7,99	-14,91	-18,76	-7,99	-15,31	-7,61	-24,31

Para avaliar os efeitos dos reagentes no W_e dos filmes, foi realizado um ajuste por regressão e Análise de Variância - ANOVA. O nível de significância adotado para estas análises foi de 5%.

Conforme pode ser visto na tabela 5 e no gráfico 1, as únicas variáveis significativas são a quitosana e a interação entre ela e o tween 80. Entretanto, como o tween sozinho não passou no teste, podemos desconsiderar que essa interação seja importante. No gráfico 2, podemos observar que o ponto com menor variação é o que corresponde a formulação de quitosana a 1%, tween 80 0% e glicerol a 0,5%, sendo este um dos critérios para escolha desta formulação, como a mais adequada, para aplicação em carne.

Tabela - 7 Resultados da ANOVA ao nível de significância de 5%

Fator	p
(1) % Glicerol L	0.108
(2) % Tween 80 L	0.052
(3) % Quitosana L	0.000
1*2	0.257
1*3	0.204
2*3	0.018

Gráfico 1 – Gráfico de Pareto indicando influência positiva para as variáveis, ou interações delas, cujas barras ultrapassam a linha vermelha tracejada

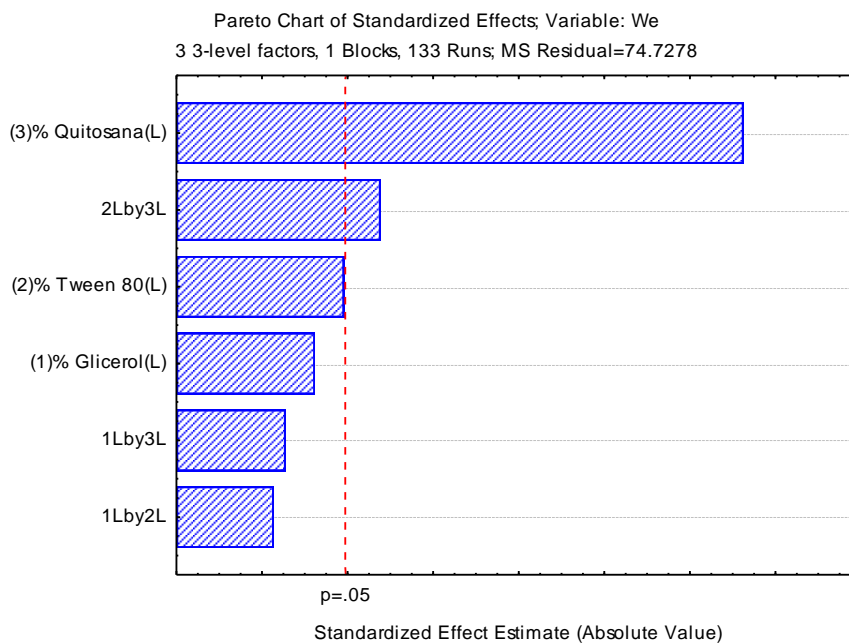
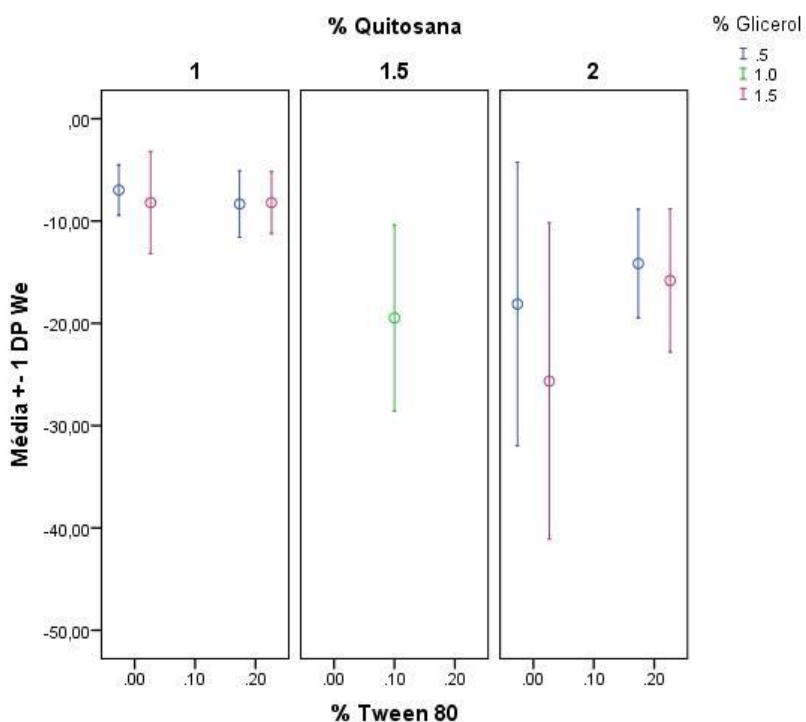


Gráfico 2 - Médias e desvios-padrão do We



4.3 Determinação da permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água

O valor obtido para a permeabilidade ao vapor d'água do filme selecionado foi de $5,16 \pm 0,83 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$. Este valor está na mesma escala de grandeza obtida por Pellissari *et al.* (2009), que foi de $1,39 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$ e próximo ao obtido por Bonilla *et al.* (2012), que obteve valores entre 3,30 e $8,96 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$, também para filmes a base de quitosana. Estas diferenças se devem as diferentes formulações dos filmes estudados.

A permeabilidade ao vapor d'água é um dos fatores mais importantes com relação às propriedades do filme, em especial no caso de revestimento para carne, um alimento rico em água, pois ela determina se o filme irá ajudar a manter a suculência do produto e evitar o acúmulo de água livre, rica em nutrientes, que favorece a proliferação microbiana.

4.4 Determinação de permeabilidade, do filme selecionado, aos gases O₂ e CO₂

Os valores obtidos para as permeabilidades aos gases O₂ e CO₂, respectivamente foram de $1,53 \pm 0,73 \cdot 10^{-15} \text{ g} \cdot \text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ e de $1,20 \pm 0,06 \cdot 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2)^{-1}$. Fajardo *et al.* (2010), em um filme à base de quitosana elaborado para queijo, obteve os valores de $7,12 \cdot 10^{-15} \text{ g} \cdot \text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ para O₂ e $1,07 \cdot 10^{-13} \text{ g} \cdot \text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ para CO₂. Já Bourbon *et al.* (2011), em um filme comestível de quitosana sem aplicação definida, obteve os valores de $5,17 \cdot 10^{-14} \text{ g} \cdot \text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ para O₂ e de $5,86 \cdot 10^{-13} \text{ g} \cdot \text{m} \cdot (\text{Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ para CO₂. Tendo em vista que o filme utilizado foi elaborado para carne, é importante que a propriedade de barreira gasosa seja maior para o O₂ e menor para o CO₂, pois a retenção de O₂ e liberação de CO₂ são importantes na manutenção da cor vermelha (oximioglobina), desejável na carne.

4.5 Determinação de espessura e de propriedades mecânicas de um filme de quitosana

A espessura média dos filmes foi de $87 \pm 11 \mu\text{m}$. A média da elongação máxima até a ruptura foi de $37,2 \pm 2,7 \text{ mm}$ e da tensão máxima para ruptura foi $3,7 \pm 0,9 \text{ MPa}$.

A espessura média deste filme, foi praticamente a metade da obtida por Bourbon *et al.* (2011), para um filme de quitosana também, de $174 \pm 9 \mu\text{m}$. Mesmo assim, o alongamento de $74,46 \pm 5,47\%$ foi praticamente igual ao obtido por estes autores ($69,84 \pm 4,08\%$), embora a tensão máxima para ruptura obtida por eles tenha sido em média mais de 3 X superior ($11,58 \pm 1,20 \text{ MPa}$). Isso demonstra que, embora o filme obtido, neste trabalho, seja menos espesso e frágil, a sua flexibilidade é muito maior, podendo talvez ser o dobro.

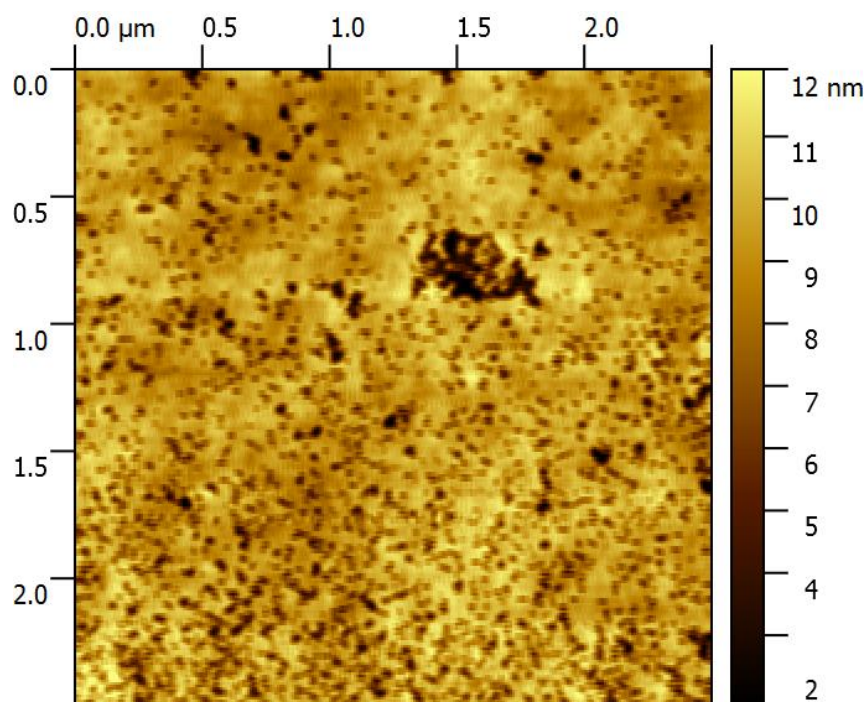
4.6 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado

O teor de umidade e a solubilidade obtidos para o filme escolhido foram, respectivamente de $59,1 \pm 1,2\%$ e $26,6 \pm 2,8\%$. Fundo *et al.* (2015) obteve em média, para filmes de quitosana a 1%, teor de umidade de $38,8 \pm 3,8\%$ e solubilidade de 56,84%. Como o filme sintetizado foi desenvolvido para uso em carne *in natura*, um alimento com elevado teor de umidade e atividade de água, a alta solubilidade não é interessante, pois o filme não manteria sua integridade e perderia suas propriedades de barreira.

4.7 Caracterização de superfície, do filme selecionado por microscopia de força atômica (MFA)

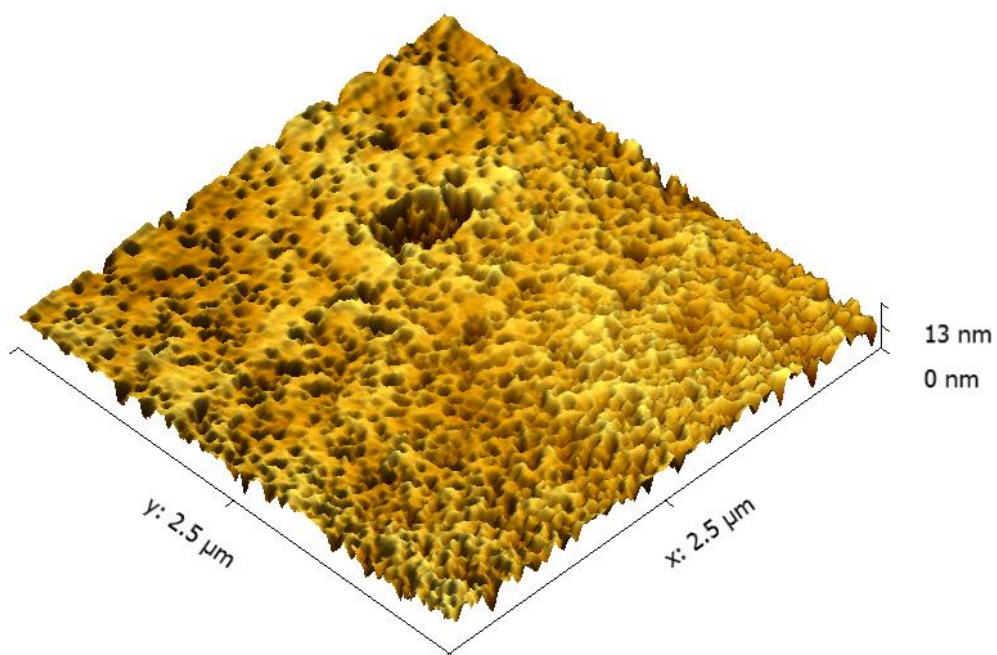
Nas figuras 7 e 8, é possível observar a grande porosidade da matriz polimérica de quitosana, preparada na formulação escolhida e desidratada. Esta porosidade é determinante nas propriedades de barreira do filme.

Figura 7 – Imagem 2D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 – Imagem 3D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.

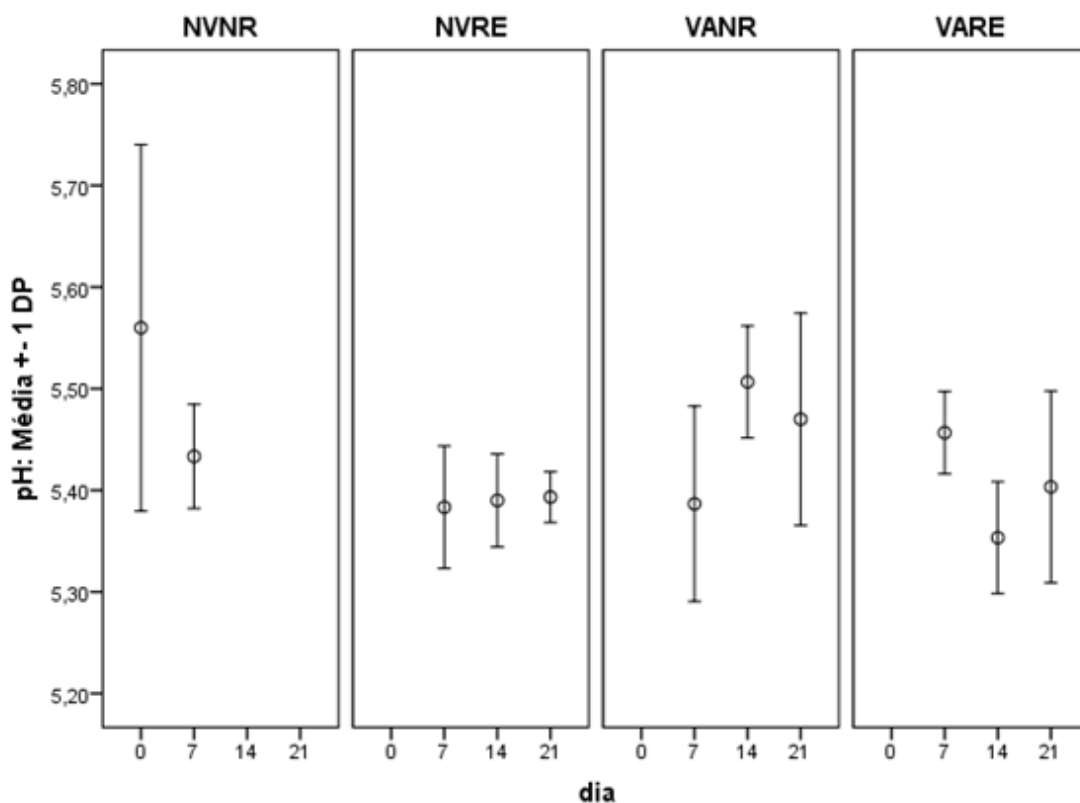


Fonte: Arquivo pessoal.

4.8 Determinação de pH de amostras de carne

Para este parâmetro, as únicas constatações foram que, embora tenha havido uma pequena variação entre os tratamentos no 14º dia, as médias de todos eles se mantiveram em 5,42 no 7º, 14º e 21º dia, havendo uma tendência geral não significativa de redução entre o pH inicial, sem tratamento, que era de 5,56, conforme pode ser visualizado no gráfico 3. Este valor final médio de pH foi próximo ao obtido por Laville *et al.* (2009) para carne fresca *in natura*, embalada a vácuo em PVC, também após 21 dias, que foi de 5,46.

Gráfico 3 – Médias e desvios-padrão do pH



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR – a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida;

Na análise estatística para este parâmetro, foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5% e os softwares utilizados foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8. Na tabela 6, abaixo, é possível ver que houve diferença significativa entre as médias de VANR e os outros dois tratamentos, no 14^o.

Tabela 6 – Médias e desvios-padrão (dp) dos valores de pH obtidos a partir do 7^o dia de experimento

Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
pH	NVNR	5,43a	0,05	-	-	-	-
	NVRE	5,38a	0,06	5,39 a	0,05	5,39a	0,03
	VANR	5,39a	0,10	5,51 b	0,06	5,47a	0,10
	VARE	5,46a	0,04	5,35 a	0,06	5,40a	0,09

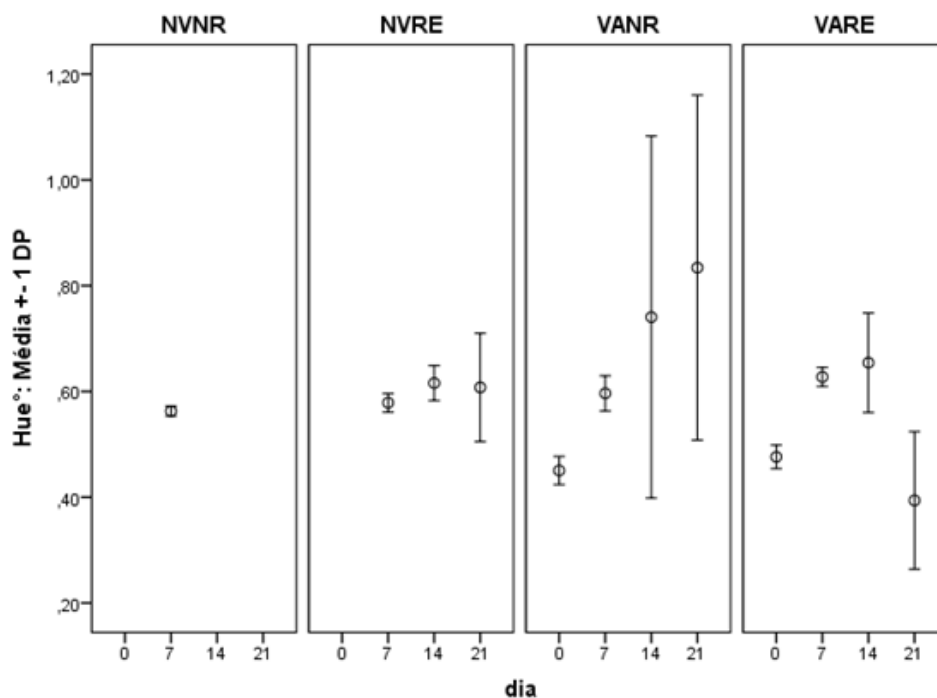
NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

4.9 Avaliação colorimétrica

No gráfico 4, abaixo, é possível ver a variação das cores, por meio dos valores dos ângulos de Hue, das diferentes amostras, ao longo das semanas,

lembrando que 0° corresponde à cor vermelha.

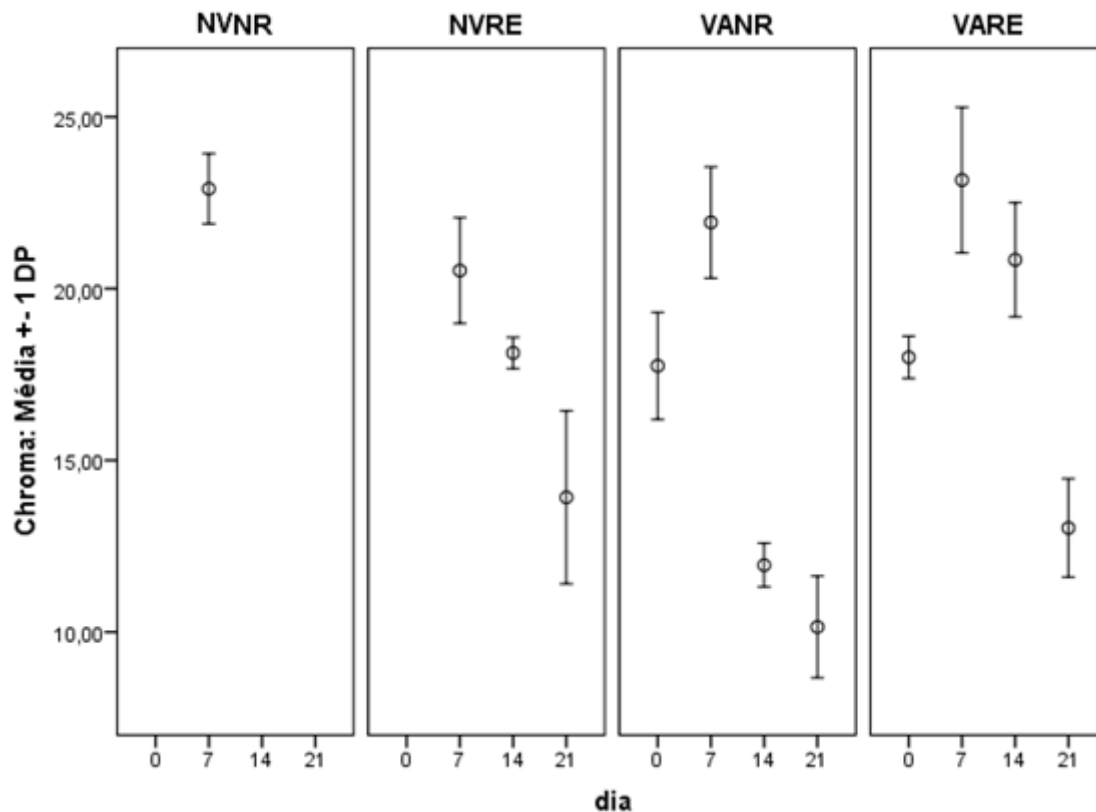
Gráfico 4 - Médias e desvios-padrão (dp) de ângulo de Hue



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida.

No gráfico 5, é possível observar o comportamento da matiz das cores ao longo das semanas e com relação aos tratamentos, sendo que ocorre um aumento no 7º dia em relação ao 1º, seguido por duas quedas no 14º e 21º dia.

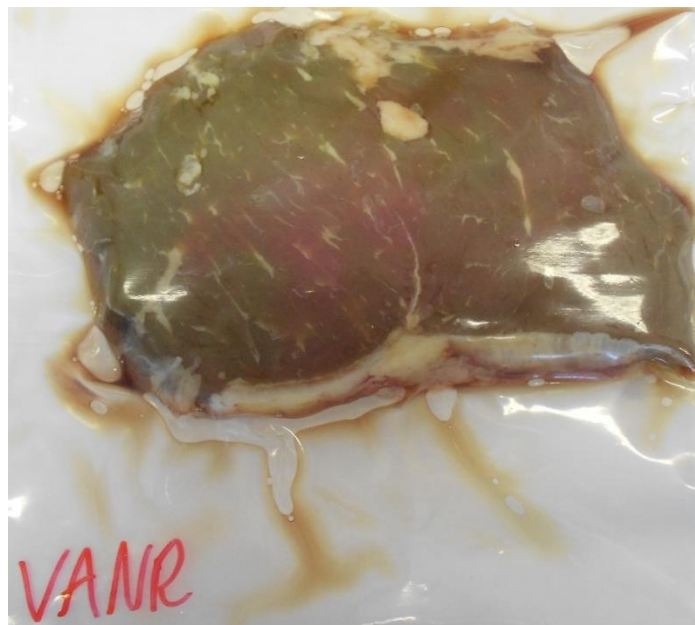
Gráfico 5 - Médias e desvios-padrão de croma



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida

As figuras 9, 10 e 11 são de amostras de carne no 21º dia de experimento. É possível observar que a amostra VARE (11) apresenta uma coloração mais próxima do que se espera para carne bovina fresca, em relação as amostras VANR (9) e NVRE (10).

Figura 9 - Amostra de carne, embalada a vácuo em PVC e não revestida, no 21º dia de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 - Amostra de carne, embalada sem vácuo em PVC e revestida, no 21º dia de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11 - Amostra de carne, embalada a vácuo em PVC e revestida, no 21º dia de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5%. Na tabela 7, abaixo, é possível apenas observar que no 7º dia houve uma pequena diferença entre as médias dos diferentes tratamentos, com relação ao ângulo de Hue e na tabela 8, foram observadas diferenças no 14º dia com relação à matiz (Croma) entre os três tratamentos, sendo que as melhores condições foram VARE e NVRE, nesta ordem.

Tabela 7 - Médias e desvios-padrão (dp) de ângulos de Hue

Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
Hue	NVNR	0,56 a	0,01	-	-	-	-
	NVRE	0,58 a	0,02	0,62a	0,03	0,61a	0,10
	VANR	0,60 ab	0,03	0,74a	0,34	0,83a	0,33
	VARE	0,63 b	0,02	0,65a	0,09	0,39a	0,13

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

Tabela 8 - Médias e desvios-padrão (dp) de croma

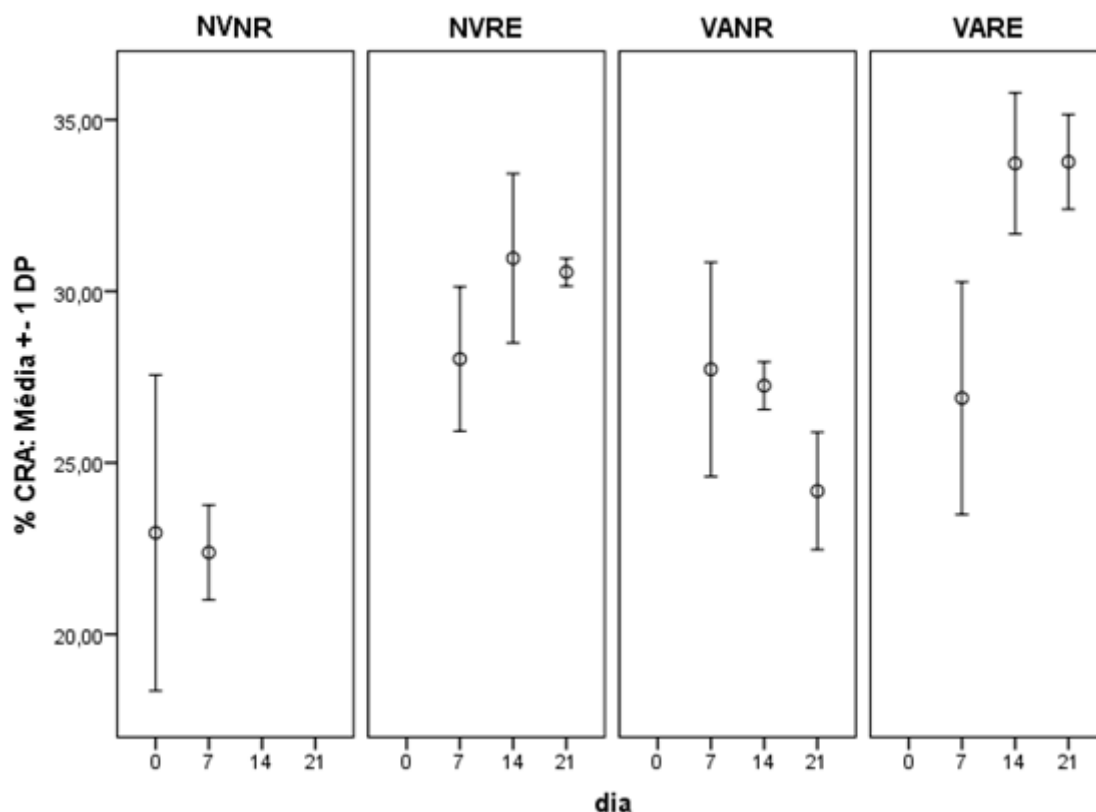
Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
Croma	NVNR	22,91a	1,02	-	-	-	-
	NVRE	20,53a	1,54	18,13 b	0,45	13,92a	2,52
	VANR	21,93a	1,62	11,95 a	0,64	10,15a	1,48
	VARE	23,16a	2,12	20,84 c	1,67	13,03a	1,43

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

4.10 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA)

No 7º dia, foi possível observar, no gráfico 6 que a média das amostras NVNR foi inferior às demais. A partir do 14º dia, as médias de CRA das amostras VANR começaram a diminuir e das NVREs e VAREs a aumentar, sendo que no 21º dia a CRA média das VANRs diminuiu ainda mais e das RES se mantiveram, como pode ser observado no gráfico 6.

Gráfico 6 - Médias e desvios-padrão de CRA (%)



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5% e os softwares utilizados foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8. Na tabela 9, é possível observar que no 14º dia há diferença estatisticamente significativa entre as médias de NVRE, VANR e VARE, porém não significativa entre NVRE e VARE. Já no 21º dia os valores destas médias se distanciaram sendo que a CRA média das amostras VARE foi superior à de NVRE, que por sua vez superou VANR.

Tabela 9 - Médias e desvios-padrão (dp) de CRA (%)

Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
CRA	NVNR	22,38a	1,38	-	-	-	-
	NVRE	28,03a	2,10	30,96 a b	2,47	30,56 b	0,40
	VANR	27,73a	3,12	27,25 a	0,70	24,18 a	1,71
	VARE	26,88a	3,39	33,73 b	2,06	33,77 c	1,38

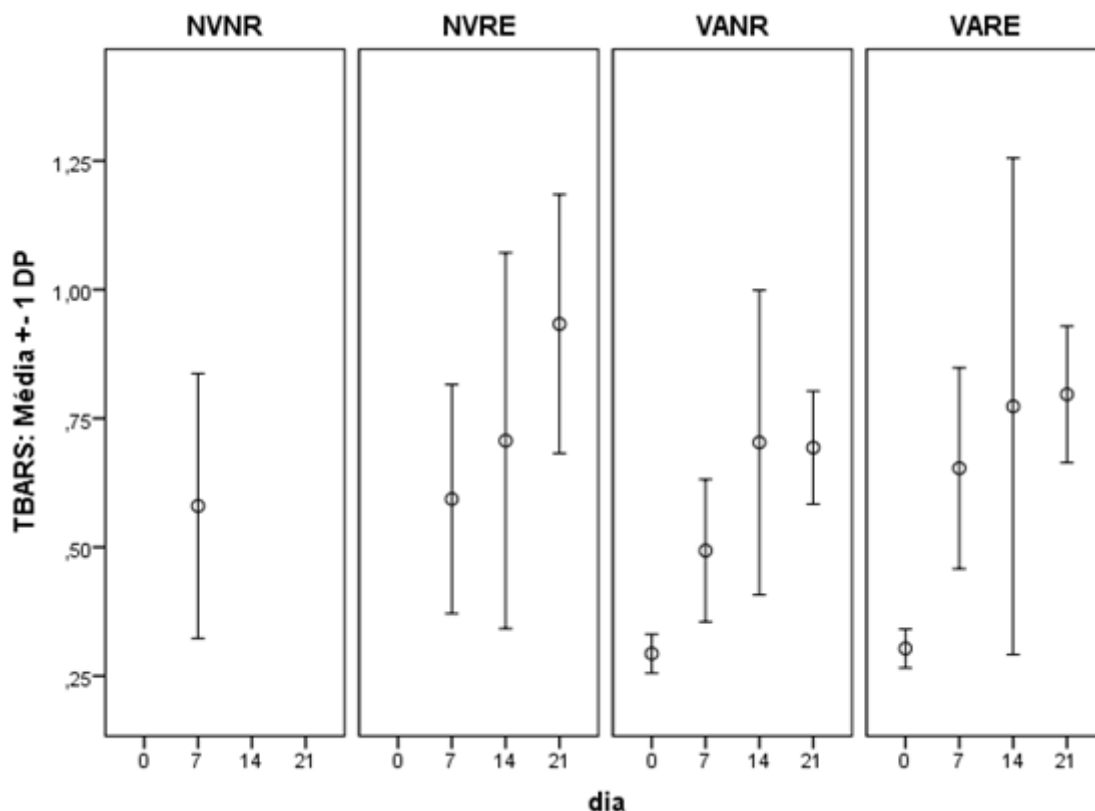
NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

Baseado nestas medidas e análises, é possível afirmar que o revestimento de quitosana e glicerol favorece a retenção de água em amostras de carne *in natura* (*L. dorsí*) fatiada, ao longo do tempo de maturação utilizado neste estudo, que foi de 21 dias, o que confere maior suculência ao produto. Além disso, quando embalada a vácuo esta retenção é ainda maior.

4.11 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS)

No decorrer do experimento houve um aumento significativo no valor médio deste parâmetro, para todos os tratamentos, porém a diferença entre eles foi muito pequena, conforme pode ser observado no gráfico 7.

Gráfico 7 - Médias e desvios-padrão de TBARS



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5% e os softwares utilizados foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8. Na tabela 10 é possível observar que não há qualquer diferença significativa entre as médias, pois nem existem letras junto as médias na tabela e as barras de erros sempre coincidem no gráfico 7.

Tabela 10 - Médias e desvios-padrão de TBARS

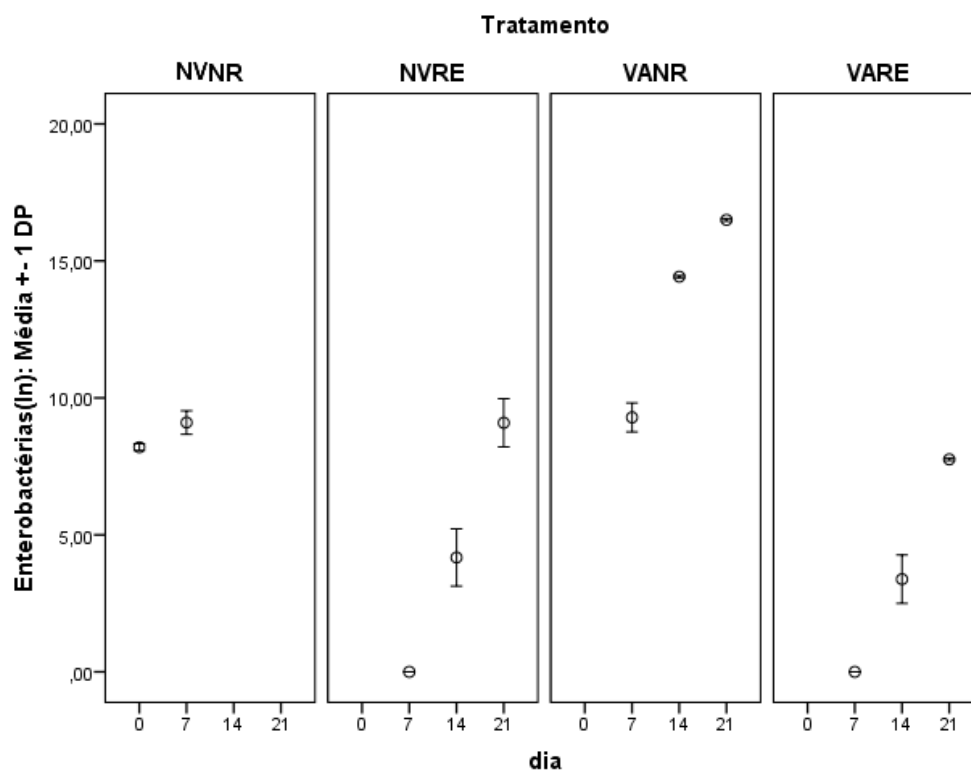
Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
TBARS	NVNR	0,58a	0,26	-	-	-	-
	NVRE	0,59a	0,22	0,71a	0,36	0,93a	0,25
	VANR	0,49a	0,14	0,70a	0,30	0,69a	0,11
	VARE	0,65a	0,20	0,77a	0,48	0,80a	0,13

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

4.12 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-láticas (BALs) e psicotróficas totais em amostras de carne

Com relação às enterobactérias, foi possível observar que houve um efeito bacteriostático nas amostras revestidas com solução de quitosana, que retardou a proliferação delas em pelo menos uma semana, sendo que o vácuo auxiliou neste efeito, conforme pode ser visto no gráfico 8, quando comparamos aos números de NVRE, maiores que os de VARE.

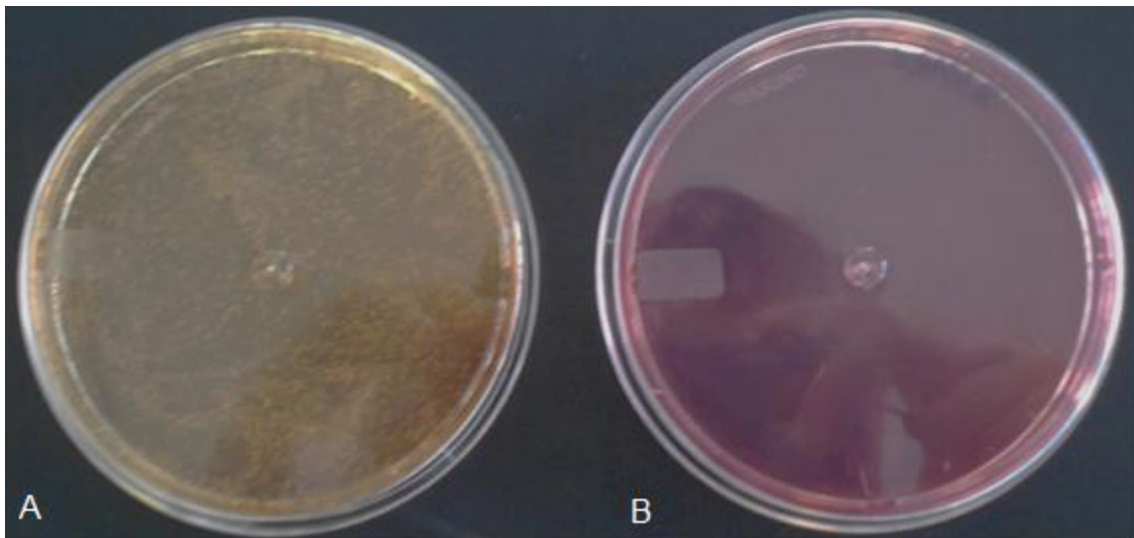
Gráfico 8 - Médias e desvios-padrão em $\ln \text{UFC.mL}^{-1}$ para Enterobactérias totais



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Valores transformados em ln

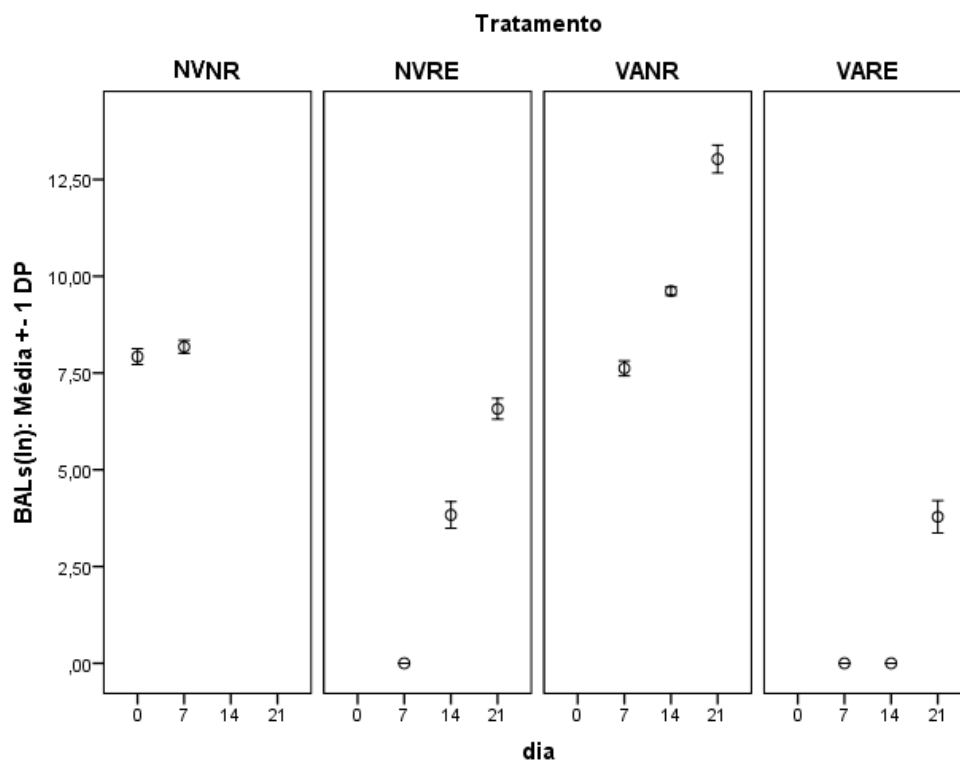
Na figura 12, é possível observar a diferença na coloração do meio de cultura MacConkey, quando ocorre crescimento de enterobactérias que degradam lactose (A) ou não (B). Isso ocorre devido à presença do corante vermelho neutro, que indica quando o pH inicial em torno de $7,1 \pm 0,2$ diminui para 6,8 ou menos, tornando o meio amarelado.

Figura 12 – Placas de Petri contendo meio MacConkey com crescimento de enterobactérias (A) e sem crescimento (B).



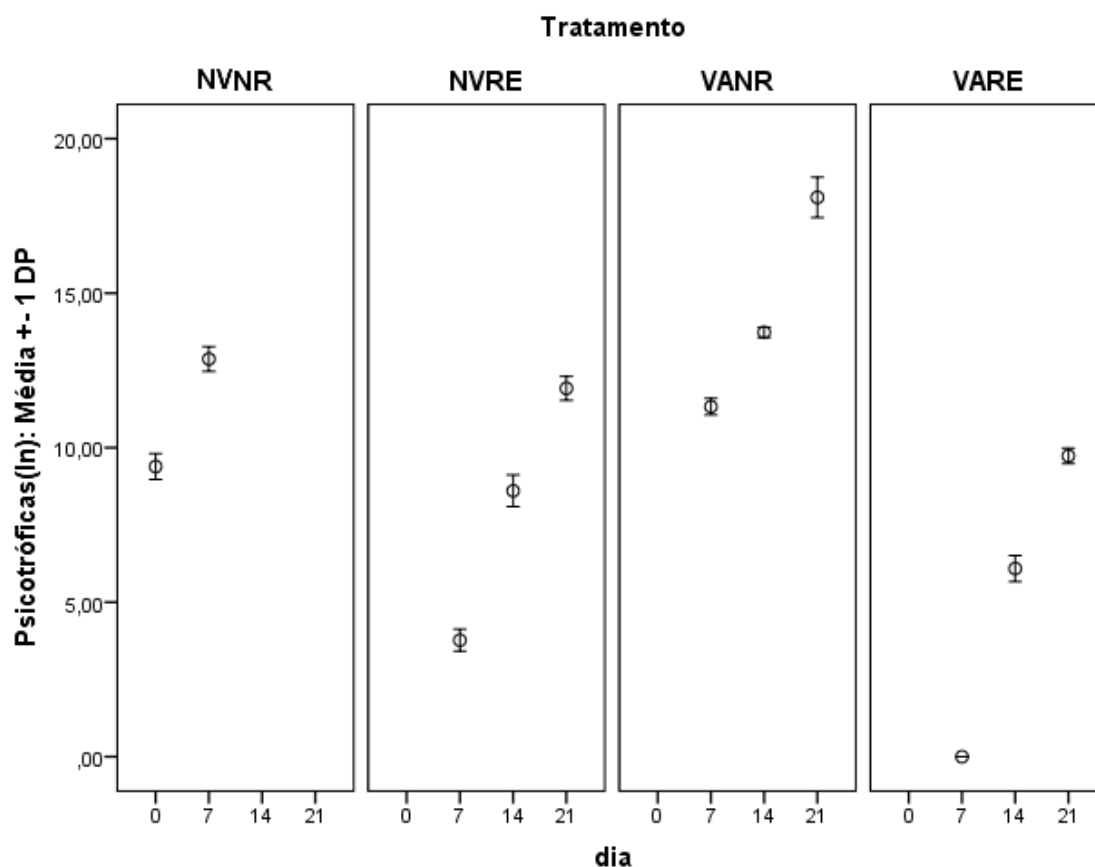
Fonte: Arquivo pessoal.

Para as BALs o efeito do revestimento foi ainda mais interessante, pois nas amostras VARE não houve qualquer crescimento até o 14^o dia, embora tivessem crescimento neste mesmo dia nas amostras NVRE, o que surpreende pelo fato de serem microaerófilas ou estritamente anaeróbias, embora também tenham encontrado condições favoráveis no 7^o dia nas amostras NVNR, como podemos observar no gráfico 9. Uma provável explicação, seria o surgimento de microambientes favoráveis, com reduzidas concentrações de oxigênio. Nas amostras VANR o crescimento deste grupo de bactérias foi absolutamente superior.

Gráfico 9 - Médias e desvios-padrão em $\ln \text{UFC.mL}^{-1}$ para BALS totais

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Valores transformados em \ln

As bactérias psicotróficas, ou psicrófilas, só sofreram inibição total na primeira semana nas amostras VARE, entretanto, é possível perceber no gráfico 10 que o revestimento comestível, mesmo sem vácuo, inibiu o crescimento deste grupo. A partir do 14º dia ocorre uma ascensão no crescimento destas bactérias nas amostras tratadas com solução de quitosana a 1% (gráfico 10) porém este número só se aproxima do parâmetro inicial no 21º dia. O crescimento deste grupo de bactérias nas amostras VANR foi superior, maior apenas pelo grupo NVNR no 7º e único dia deste, como pode ser visto gráfico 10.

Gráfico 10 - Médias e desvios-padrão em $\ln \text{ UFC.mL}^{-1}$ para Psicrotróficas totais

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Valores transformados em \ln

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5%. Na tabela 11 é possível observar que, para todos os grupos de bactérias avaliados, só não há diferença significativa estatisticamente entre os valores obtidos no 7º dia para os tratamentos NVNR e VANR, NVRE e VARE no grupo das enterobactérias, e entre NVRE e VARE no grupo das BALs. No 14º dia só não há diferença entre NVRE e VARE para o

grupo das enterobactérias. No 21º dia todos os valores são estatisticamente distintos.

Tabela 11 - Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Duncan

Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	Dp	Média	dp	Média	dp
Entero*	NVNR	9,1016 b	0,2488	-	-	-	-
	NVRE	0,00 a	0,0000	4,1733 a	0,6031	9,0899 b	0,5067
	VANR	9,2898 b	0,3059	14,4265 b	0,0235	16,5003 c	0,0281
	VARE	0,00 a	0,0000	3,3821 a	0,5107	7,7572 a	0,0273
BAL*	NVNR	8,1793 c	0,0972	-	-	-	-
	NVRE	0,00 a	0,0000	3,8336 b	0,1977	6,5745 b	0,1555
	VANR	7,6211 b	0,1118	9,6165 c	0,0618	13,0302 c	0,2070
	VARE	0,00 a	0,0000	0,00 a	0,0000	3,7854 a	0,2417
Psicro*	NVNR	12,8710 d	0,2316	-	-	-	-
	NVRE	3,7716 b	0,2054	8,6043 b	0,2961	11,9198 b	0,2258
	VANR	11,3292 c	0,1556	13,7336 c	0,0966	18,1009 c	0,3768
	VARE	0,00 a	0,0000	6,0882 a	0,2453	9,7357 a	0,1427

Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

* Variáveis transformadas para realização dos testes - ln

4.19 Caracterização das nanopartículas de própolis

4.19.1 Caracterização do extrato de própolis

Foi obtido um extrato de coloração verde escura, com odor característico, e um sedimento mais claro no fundo, de compostos resinosos insolúveis em etanol, que foi deixado precipitar.

A absorvância média do extrato etanólico de própolis – EEP, diluído 40X foi 0,373, o que é equivalente a 96,78 mg de fenóis totais equivalentes em ácido gálico por grama de extrato ou 9,68%. Em própolis em bruto, o teor mínimo requerido de compostos fenólicos é de 5% (m/m) de fenóis totais equivalentes em ácido gálico por grama de extrato (Brasil, 2001).

O conteúdo de flavonoides totais equivalentes em quercetina no EEP foi de 42,28 mg.g⁻¹ ou 4,23%. Em própolis bruta, o teor mínimo requerido de flavonoides é de 0,5% (m/m) (Brasil, 2001). Cabral (2012) obteve 0,32% e 6,15% em extratos diferentes. Pelatti (2013) obteve 0,25% e 16,8%, também em extratos diferentes. Mello (2012) obteve a partir de cerca de 3,55% em extrato aquoso até 10,06% em extrato etanólico. A quantidade de flavonoides é muito variável e depende do tipo de própolis (origem), do solvente e do método de extração.

A capacidade antioxidante do EEP foi de 79,62% em relação ao padrão de controle (Trolox). Cabral (2012), avaliou a capacidade antioxidante de dois diferentes extratos etanólico de própolis, obtendo os valores de 21,7 e 53,0%. Mello (2012), na mesma análise, usando trolox como padrão, obteve um valor de quase 50%. Campos (2014) chegou a obter $98 \pm 0,4\%$ de capacidade antioxidante, também com extrato etanólico de própolis.

Este resultado demonstra que o extrato utilizado apresenta elevada capacidade antioxidante, embora existam outros mais eficientes ainda.

Dos sete compostos-padrão avaliados, foram identificados cinco deles presentes no EEP utilizado, conforme pode ser observado nas gráficos 11 e 12. Foram eles: ácido caféico, crisina, ácido ferúlico, campferol, ácido p-cumárico, quercetina e sakuranetina.

Gráfico 11 – Cromatograma do extrato de própolis com compostos identificados

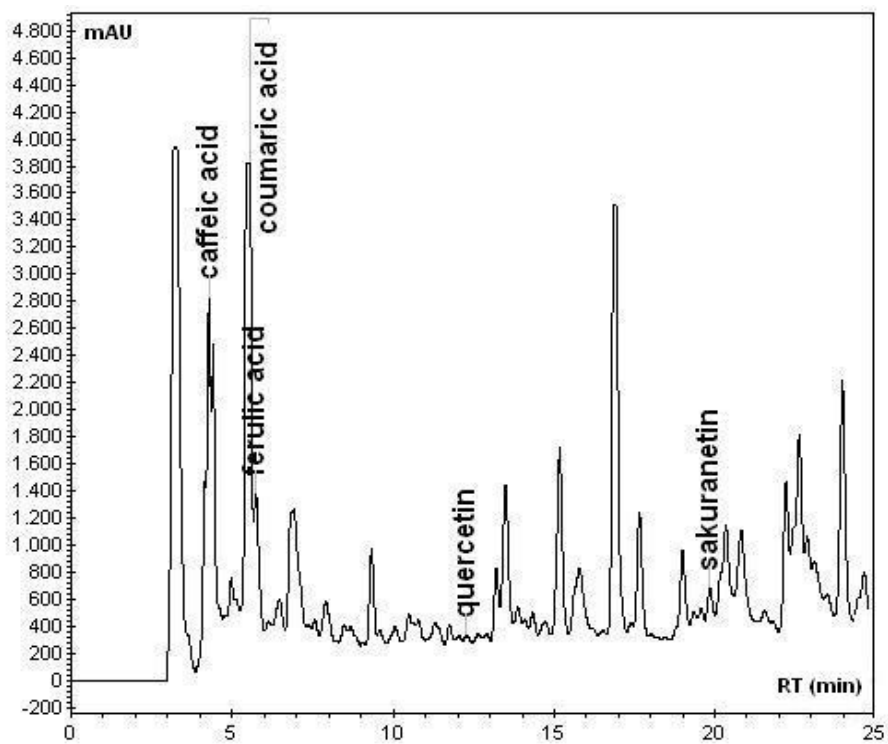
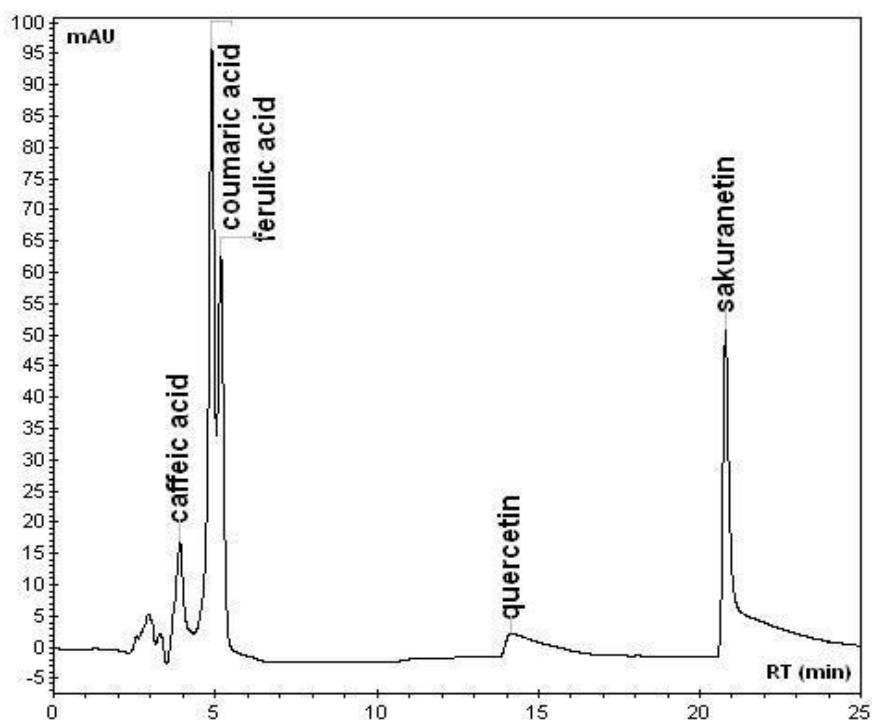


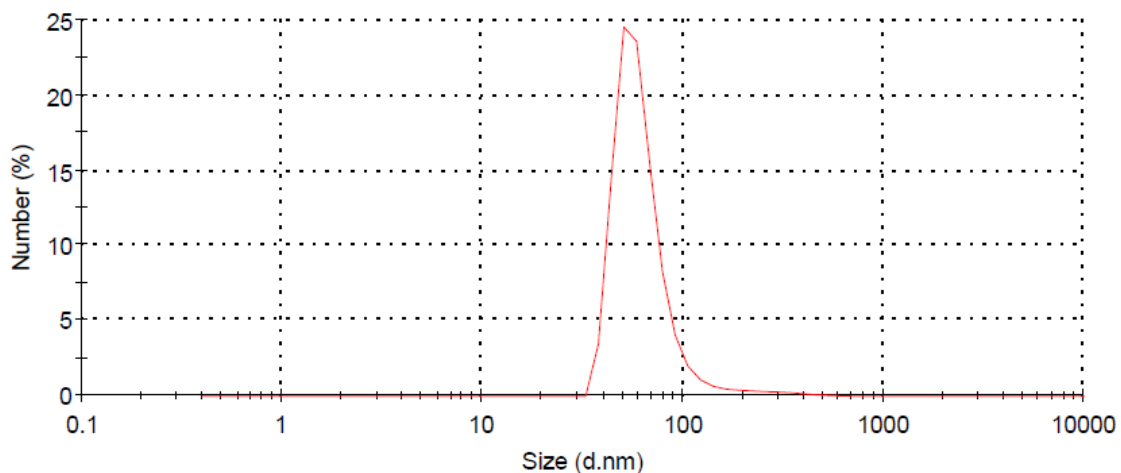
Gráfico 12 – Cromatograma dos compostos fenólicos padrão



4.1.2 Caracterização das nanopartículas de própolis

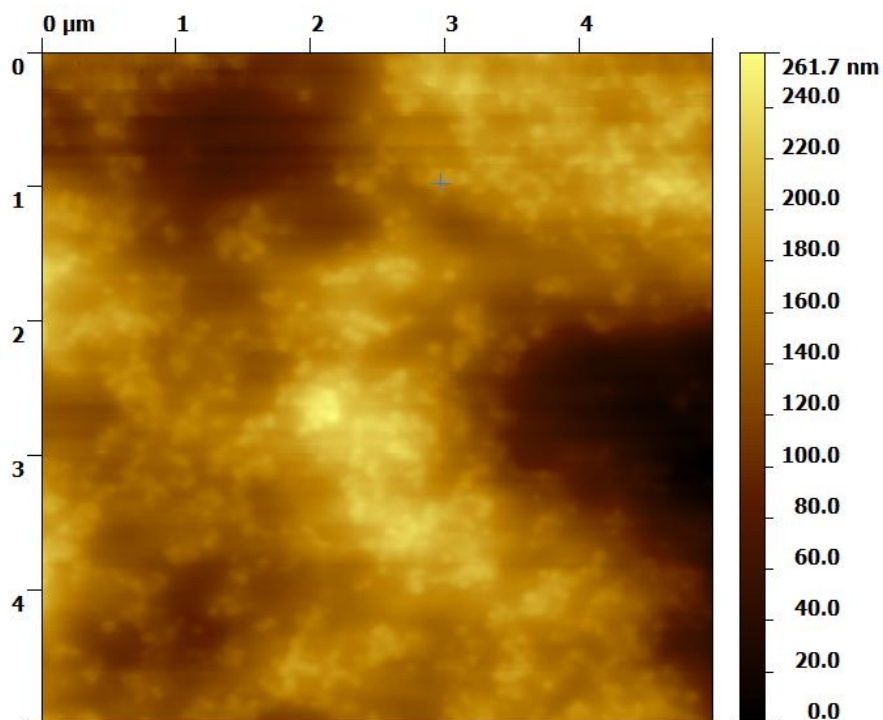
Foi obtida uma solução de coloração amarela clara, com odor mais suave, em relação ao extrato e sem sedimento. Após medições, do diâmetro médio de partículas, pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL), percebeu-se que o diâmetro médio das nanopartículas, em pH 4,61, era de 65,46 nm, conforme pode ser observado no gráfico 13.

Gráfico 13 – Determinação de diâmetro médio de nanopartículas de própolis, por EDL.



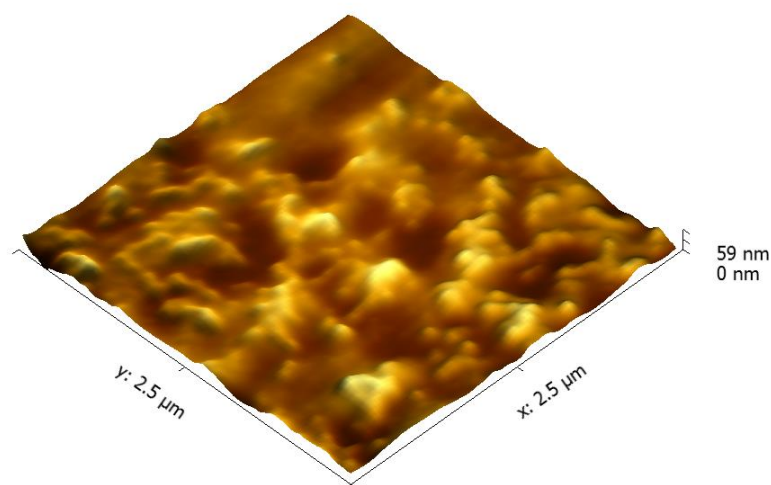
Pelas medições feitas com o software Gwyddion (versão 2.31), em imagens obtidas por MFA, como pode ser observado nas figuras 13, 14 e no gráfico 14, pôde-se concluir que o tamanho das nanopartículas (pH 4,61) foi de aproximadamente 75 nm.

Figura 13 - Imagem 2D de nanopartículas de própolis, obtida por MFA.



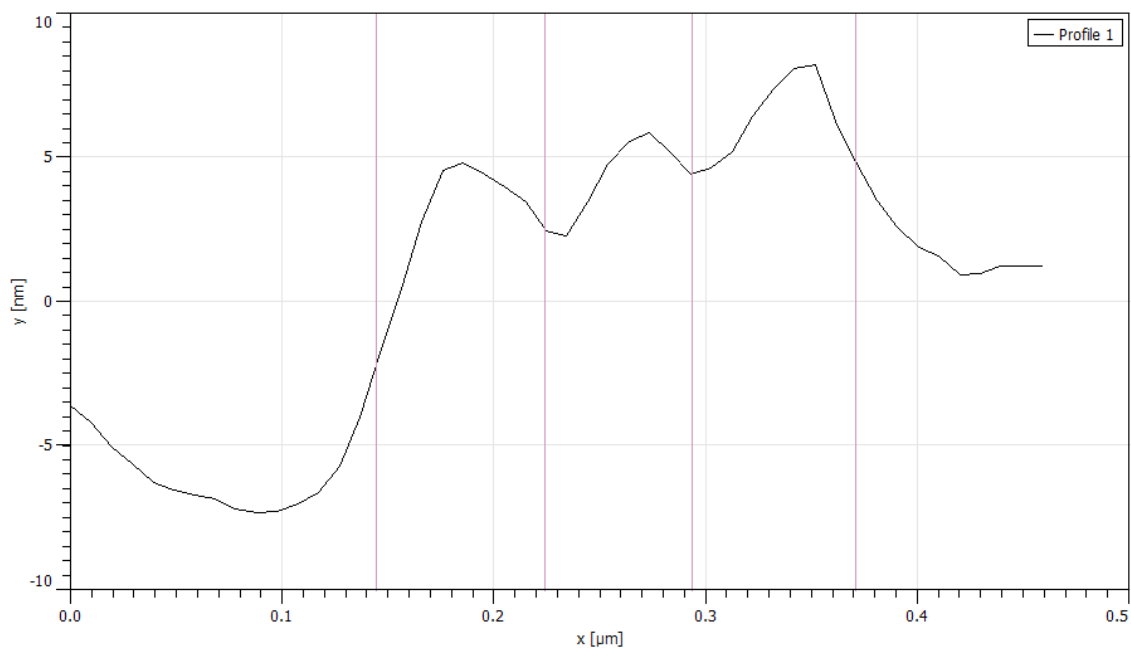
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 - Imagem 3D de nanopartículas de própolis, obtida por MFA.



Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico 14 – Determinação do tamanho de nanopartículas de própolis, por MFA



Uma possível explicação para essa diferença de tamanhos, é que se tratam de técnicas diferentes de medição do tamanho das partículas. Outra hipótese é a de não existir uniformidade no tamanho das nanopartículas, devido à formação de aglomerados.

4.2 Determinação da MIC do extrato e das nanopartículas de própolis

Foi feito teste t-student, para comparar a diferença entre as MICs de todas as concentrações de EEP e NPs testadas para as todas as espécies bacterianas e obteve-se um nível de significância (p) inferior a 3% para todas as comparações de concentrações.

Conforme pode ser observado na tabela 12, houve inibição de todas as espécies submetidas a bioensaio. Isto foi inesperado, em especial no caso das espécies gram-negativas, pois pela literatura é relatado que a própolis possui melhor efeito contra gram-positivas (Kalogeropoulos et al., 2009; Jug *et al.*, 2014).

Tabela 12 – MIC e tamanho médio dos halos inibitórios de 8 gêneros microbianos comumente presentes em carne bovina.

Micro-organismo	Concentrações mínimas inibitórias - NPs (MICs) (g.L ⁻¹)	Tamanhos dos halos de inibição (mm)	Concentrações mínimas inibitórias – EEP (MIC) (g.L ⁻¹)	Tamanhos dos halos de inibição (mm)
<i>Enterobacter helveticus</i> (Gram -)	8,14	1,53	24,55	1,33
<i>Salmonella Thompson</i> (Gram -)	2,28	1,73	12,28	2,33
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	4,10	1,60	12,28	1,87
<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram +)	6,10	1,67	12,28	1,93
<i>Lactobacillus buchneri</i> (Gram +)	8,14	1,47	24,55	1,60
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Gram +)	6,10	0,90	12,28	0,67
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram +)	6,10	2,10	12,28	3,50
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	2,03	1,97	2,46	3,67

S. aureus (Gram +), ilustrada na figura 3-A, foi a espécie mais sensível a ambas as formas da própolis testadas, com MIC de 2,03 para as NPs e 2,46 g.L⁻¹ para EPE. Em seguida, *S. Thompson* e *E. coli*, ambas Gram -, com MICs respectivamente de 2,28 e 4,10 g.L⁻¹ para as NPs e de 12,28 g.L⁻¹ para EEP para ambas. Curiosamente, as espécies mais resistentes, dentre as oito avaliadas, foram *E. helveticus* (Gram -), ilustrada nas figuras 3-B e *L. buchneri* (Gram +), com MICs de 8,14 e 24,55 g.L⁻¹, respectivamente para NPs e EEP. Esta constatação, embora haja uma diferença no tamanho dos halos inibitórios,

se opõe a hipótese de que todas as Gram + sejam mais sensíveis à própolis. Talvez esta sensibilidade não esteja ligada somente à estrutura da parede celular das bactérias quanto se supõe.

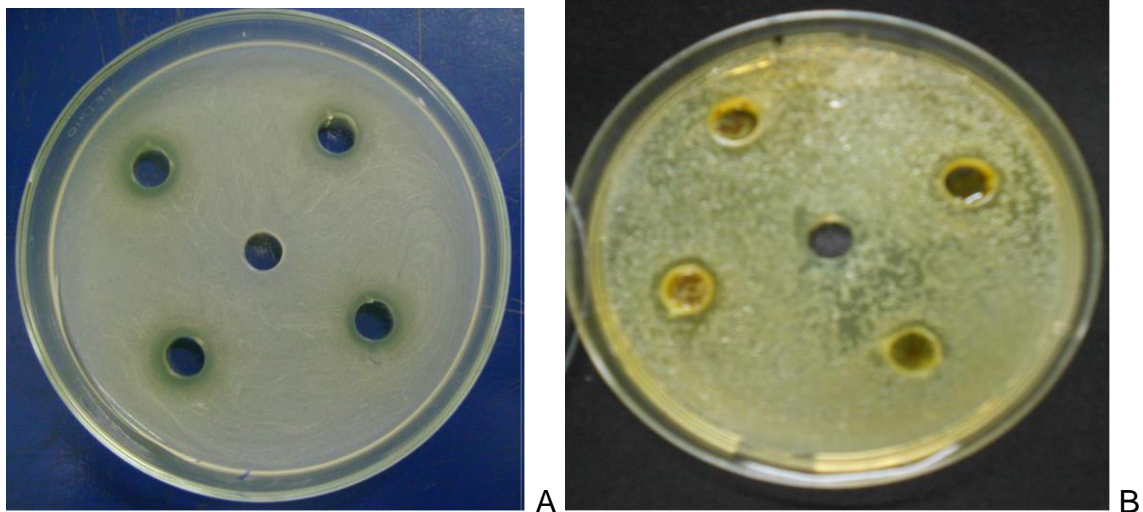


Figura 3 – Exemplos de bioensaios de inibição com presença de halos de inibição; A) *S. aureus* e EEP; B) *E. helveticus* e NPs.

Porém, tanto no caso do extrato etanólico de própolis (EEP) quanto das nanopartículas (NPs), todas as MICs ainda foram consideradas relativamente elevadas para a aplicação destas substâncias em revestimento comestível para carne, devido à intensa coloração e odor provocados pelas mesmas. Entretanto, existe a possibilidade de outras aplicações, como por exemplo em hambúrgueres ou carne bovina processada e pré-temperada.

5. CONCLUSÕES

- A permeabilidade do filme produzido neste trabalho, é em torno de 4 a 30 vezes menor ao gás O₂ e de pouco menos de 10 até mais de 40 vezes maior ao CO₂, em relação aos trabalhos citados, o que é muito importante na manutenção da cor vermelha (oximioglobina), desejável na carne, pois ocorre entrada/retenção de O₂ e liberação de CO₂, cuja concentração atmosférica é muito menor que a do O₂ (0,035 e 20,95% respectivamente);
- O filme desenvolvido no presente trabalho possui alto teor de umidade e baixa solubilidade relativos, quando comparado a outros trabalhos, o que é interessante para aplicação em carne, pois mantém sua propriedade de barreira e integridade, mesmo sob elevada umidade e possível atividade de água;
- Com relação à coloração (Hue) das amostras, no 7º dia houve uma pequena desvantagem das amostras revestidas e a vácuo em relação às que não estavam a vácuo. Porém, no 14º dia o brilho (Croma) das amostras nesta condição foi superior e não houve diferença significativa na coloração. Portanto, baseado nas análises deste trabalho, esta condição ainda pode ser considerada mais vantajosa, quando se avalia a carne por um período de tempo maior;
- O filme de quitosana desenvolvido no presente trabalho, melhorou a capacidade de retenção de água (CRA) de amostras de carne, o que auxilia na desejada suculência do produto, além de reduzir a Aw e conseqüentemente auxiliar na conservação do mesmo;
- O filme comestível a base de quitosana, selecionado para aplicação em carne fresca *in natura*, inibiu de maneira muito significativa o crescimento de enterobactérias, bactérias ácido-láticas (BALs) e psicrotróficas totais, o que certamente poderá aumentar o tempo de prateleira deste produto;
- O extrato de própolis utilizado no presente trabalho possui teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante relativamente elevados em comparação a outros encontrados na literatura;

- Para todas as concentrações de EEP e NPs testadas, com todas as espécies bacterianas, obteve-se resultados melhores com as NPs, estatisticamente comprovados, a um nível de significância (p) inferior a 3%, o que é vantajoso devido à redução na concentração de própolis;

6. REFERÊNCIAS

ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B.; MANCIO A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 135-149, jul./set. 2005.

ANDRADE, E. N.; SILVA, R.A.M.S.; ROÇA, R. O. Manejo pré-abate de bovinos de corte no Pantanal, Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 58, n. 222 p. 304, 2009.

ASSIS, O. B. G.; ALVES, H. C. Metodologia Mínima para a Produção de Filmes Comestíveis de Quitosana e Avaliação Preliminar de seu Uso como Revestimento Protetor em Maçãs Cortadas. Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP - **Comunicado Técnico**, v. 49, p. 5, 2002.

ASTM D882-91. Standard test methods for tensile properties of thin plastic. **Annual Book of ASTM Standards**, Amer. Soc. for Testing & Materials, Philadelphia, PA, 1991.

ASTM-D-3985-02. Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. **Annual book of ASTM**, A.S.F.T.O. Materials, ed., Philadelphia, PA, 2002.

BARNES, E. M.; INGRAM, M. The effect of redox potencial on the growth of *Clostridium welchii* isolated form horse muscle. **J. Appl. Bact.**, v. 19, p. 117-128, 1956.

BATE-SMITH, E. C.; BENDALL, J. R. *Rigor mortis* and adenosinetriphosphate. **The Journal of Physiology**, v. 106, p. 177-185, 1947.

BATE-SMITH, E. C.; BENDALL, J. R. Factors determining the time course of *rigor mortis*. **The Journal of Physiology**, v. 110, p. 47-65, 1949.

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

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 103–120, 1996.

- BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; CERQUEIRA, M. A.; ROCHA, C. M. R.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; VICENTE, A. A. Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 111–118, 2011.
- BRANDÃO, F. T.; FERREIRA JUNIOR, J. C.; BRICHI, L. O.; MIRANDA, I. T. P. Exportação da carne bovina nacional: os desafios que o setor enfrentará nos próximos anos frente às novas exigências do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, v. 4, n. 2, p. 7-14, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Crescimento da demanda de alimentos no Brasil, **Nota Técnica**, Dezembro, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Valor Bruto da Produção. Dezembro, 2014.
- BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOREMA, J. Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 334–339, 2007
- CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DIAZ, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 8, p. 1452-1459, 2008.
- CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1456-1462, 2009.
- CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. (2007) Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4° C. **Food Microbiology 24**: 607–617p.
- DELAZARI, I. (1977) Microbiologia de carnes. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 52, Campinas/SP, p. 25-60, 1977.

- DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para medida de atividade de água**. 2000, 195p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry 114**: 1173–1182p.
- ECONOMOU, T.; POURNIS, N.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I.N. (2009) Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. **Food Chemistry 114**: 1470–1476p.
- ERDÖS, T. Rigor, contracture and ATP. **Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged**, v. 3, n. 51, p. 56, 1943.
- FEITOSA, T. Contaminação, conservação e alteração da carne. **Embrapa-CNPAT**, Fortaleza/CE, V. 34, 26p., 1999
- FELÍCIO, P.E. Fatores que Influenciam na Qualidade da Carne Bovina. In: A. M. Peixoto; J. C. Moura; V. P. De Faria. (Org.). Produção de Novilho de Corte. 1.ed. Piracicaba/SP. **FEALQ**, p. 79-97, 1997.
- ELLOWS, P (2000) *Food processing technology: principles and practice*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v. 80, p. 12–19, 2008.
- FIELD, R.A., RILEY, M.L. AND CHANG, Y.O. Free amino acid changes in different aged bovine muscles and their relationship to shear values. **J. Food Sci.**, v. 36, p. 611-612, 1971.
- FUNDO, J. F.; GALVIS-SANCHEZ, A. C.; DELGADILLO, I.; SILVA, C. L. M.; QUINTAS, M. A. C. The Effect of Polymer/ Plasticiser Ratio in Film Forming Solutions on the Properties of Chitosan Films. **Food Biophysics**, v. 10, p. 324–333, 2015.
- GILL, C. O., E NEWTON, K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, v.3, p. 207-217, 1978.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packing: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agriculture origin. **Food Packing and Preservation**, p. 159-181, 1994.

GONZÁLEZ, L.; BISPO, E.; MORENO, T.; MONSERRAT, L.; FRANCO, D. Enhancement of shelf life from meat proceeding from blond galician calves using antioxidant. **Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry**, v. 10, p. 3296-330, 2008.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. Porto Alegre/ RS, **Editora Artmed - 6ª ed**: 711 p., 2005.

KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G.M.B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. (2000) In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology 45**: 141-148p.

KROCHTA, J.M; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v.51, n. 2, p. 61-74, 1997.

LAVILLE, E.; SAYD, M. M.; MORZEL, M.; BLINET, S.; CHAMBON, C.; LEPETIT, G. R; HOCQUETTE, J. F. Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 10755–10764, 2009

LAWRIE, R.A. Meat science, 2ª ed., **Pergamon on Press**, Oxford, p.71, 1974.

LAWRIE, R. A. Meat science, 4ª ed., **Pergam on Press**, Oxford, p.44, 1985
Marggrand, K.; Hofmann, K. (1997) Reduction of freezer burn and loss on drying during long term storage of pork with gelatin spray solution. **Fleischwirtschaft 77(1)**: 19–20p.

LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P. (2004) A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloids 19(2)**: 303–311p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) (2015) **Projeções do Agronegócio**, Brasília, 133p.

MOSSEL, D.A.A.; MORENO-GARCIA, B. - Microbiologia de los alimentos - Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. **Acribia**, Zaragoza, Espanha, 375p., 1994.

NEVES, M. Estratégias para a Carne Bovina no Brasil. São Paulo, **Ed. Atlas**. 2012.

OBBINGER, J.L.; KRAFT, A.A. Oxidation - reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Food Science**, v. 38,1108p., 1973.

MURPHY, K. M.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P. Effect of varying the gas headspace to meat ratio on the quality and shelf-life of beef steaks packaged in high oxygen modified atmosphere packs. **Meat Science**, v. 94, p. 447–454, 2013.

PELISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. **J. Agric. Food Chem.** V. 57, p. 7499–7504, 2009.

PUGA, D.M.U.; CONTRERAS, C.J.C.; TURNBULL, M. R. Avaliação do amaciamento de carne bovina de dianteiro (*Triceps brachii*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, e. 1, p. 88-96, 1999.

SARAIVA, C. M. T. Influência do pH final e tipo de embalagem na conservação de carne de bovino da raça maronesa. **Tese – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**. Vila Real - Portugal, 297p., 2008.

URBAIN, W.M. Conservação de la carne. In: Price, J.F.; Schweigert, B.S. - Editor - *Ciência de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza, Espanha, **Acribia**, 413-461p., 1976.

USDA – United States Department of Agriculture. Acesso em 20 de julho de 2015 http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2012/livestock_0412.pdf

VENTURINI, A. C.; CASTILLO, C. J. C.; FARIA, J. A. F. Revisão: sistemas de embalagem para carne bovina fresca em atmosfera modificada. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 2, p. 128-137, abr./jun. 2009

ZISMAN, W.A. Contact angle, Wettability and Adhesion. **Advances in Chemistry**, v. 43, p. 1-51, 1964.

Jug, Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of popular chemo-type propolis by extraction procures

Mario Jug a,* , Marijana Zovko Kon_c_i_c b, Ivan Kosalec

LWT - Food Science and Technology 57 (2014) 530e537

Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus Nick Kalogeropoulos a,* , Spyros

J. Konteles b , Elena Troullidou a , Ioannis Mourtzinis a , Vaios T.

Karathanos a Food Chemistry 116 (2009) 452–461