

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE

MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE
CELULOSE BACTERIANA VISANDO APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
ATIVAS**

GIULIA BRESSAN SORATTO DA SILVA

JOINVILLE - SC

2017

GIULIA BRESSAN SORATTO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE
CELULOSE BACTERIANA VISANDO APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
ATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Andréa Lima dos Santos Schneider
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Paula Testa Pezzin

JOINVILLE - SC

2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Silva, Giulia Bressan Soratto da

S586d Desenvolvimento e caracterização de membranas de celulose bacteriana visando aplicação em embalagens ativas /Giulia Bressan Soratto da Silva; orientadora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider, co-orientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin. – Joinville: UNIVILLE, 2017.

71 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Alimentos – Embalagens. 2. Embalagens – Indústria. 3. Anti-infecciosos. 4. Alimentos – Aroma. I. Schneider, Andréa Lima dos Santos (orient.). II. Pezzin, Ana Paula Testa (co-orient.). III. Título.

CDD 658.564

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

Termo de Aprovação

“Desenvolvimento e Caracterização de Membranas de Celulose Bacteriana Visando a Aplicação em Embalagens Ativas”

por

Giulia Bressan Soratto da Silva

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)

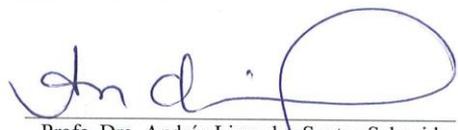


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:



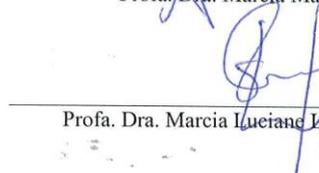
Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Marcia Margarete Meier
(UDESC)



Prof. Dra. Marcia Lueiane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Joinville, 25 de agosto de 2017.

Dedico este trabalho:

A Deus, pela minha vida.

A minha mãe Rosane, meu pai Eraldo e meus irmãos por terem me dado força para conquistar meus objetivos.

A minha sobrinha Isabela e meu afilhado Miguel que me mostraram o amor mais verdadeiro que existe e me fizeram mais feliz.

A minha vó Tereza por sempre ter me colocado em suas orações.

Aos meus melhores amigos Luan e Jairo por terem me levantado nos momentos em que enfraqueci.

A minha prima Débora por ter feito papel de filha no meu lugar quando meu pai precisou e não pude estar presente.

Ao meu namorado Renan por me fortalecer nesses últimos meses de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Univille, pela oportunidade em estudar nesta Instituição.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Andréa Lima dos Santos Schneider e também à Prof^a Dr^a. Ana Paula Testa Pezzin pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e por compartilharem seus conhecimentos comigo.

À Letícia que foi minha parceira neste tema e também às meninas do laboratório de Biotecnologia da Univille.

Ao prof^o Dr. André L. Nogueira por ceder as nanopartículas de prata.

À banca pela disponibilidade em me assistir e contribuir com comentários.

Aos meus colegas de aula do Mestrado em Engenharia de Processos.

A todos os funcionários e professores do Mestrado que com certeza contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Com o avanço da tecnologia, as embalagens tradicionais lentamente vem perdendo espaço, sendo substituídas por embalagens mais sofisticadas. Nesta direção, aumenta o desenvolvimento de novos materiais que, incorporados com determinadas substâncias, que tem ação sobre o produto que estão acondicionando, não se limitando a atuar apenas como uma barreira física. A exemplo disso, destacam-se as embalagens ativas, que permitem uma diminuição dos aditivos adicionados à composição do alimento. Dentre os materiais utilizados nestas novas embalagens propõe-se a celulose bacteriana (CB), pois apresenta propriedades favoráveis para esta aplicação, como alta resistência mecânica e à tração e a possibilidade de incorporação de compostos ativos, além de ser biodegradável. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a caracterização química e térmica de membranas de celulose bacteriana incorporadas com aroma de alecrim (20% e 100%-puro), aroma de gorgonzola e nanopartículas de prata (NpAg), para aplicação em embalagens alimentícias visando ação aromatizante e antimicrobiana. As membranas de CB foram sintetizadas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, em cultura estática e temperatura ambiente por 12 dias. Após, as membranas foram purificadas e incorporadas com os aromas e NpAg por meio de embebição seguido de secagem. Após a etapa de secagem, as membranas foram caracterizadas e aplicadas a filmes de poli(cloreto de vinila (PVC). A caracterização foi feita por meio de espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA). A análise de FTIR indicou a incorporação das NpAg na membrana, bem como o aroma de gorgonzola e o alecrim20%, diferente do que ocorreu com o alecrim puro. A estabilidade térmica foi diminuída em 38,2 °C, 24,2 °C, 1 °C e 13,4 °C para CB/NpAg, CB/Gorgonzola, CB/Alecrim100% e CB/Alecrim 20%, respectivamente, conforme análise de TGA. Pela análise microbiana, realizada conforme norma ASTM E1280, ficou comprovado a propriedade antimicrobiana para as membranas incorporadas com os aromas de alecrim (20% e 100%) e NpAg. Quanto a membrana incorporada com o aroma gorgonzola, também não houve crescimento, porém atribui-se o não crescimento microbiano a outras substâncias presentes usadas como carreadoras desse aroma. Já a aplicação das membranas nos filmes de PVC, possibilitou avaliar sua eficácia como sistema antimicrobiano e como sistema aromatizante, por meio do método afetivo (teste de aceitação) na embalagem de pães. A análise microbiana foi conduzida por avaliação visual do aparecimento de fungos filamentosos na superfície dos pães. Percebeu-se que os pães embalados com membranas de CB incorporadas com aroma de alecrim (20%) e NpAg se estenderam até 11 dias sem aparecimento de bolor, diferentemente da membrana incorporada com o aroma de gorgonzola, onde o aparecimento se deu no 8º dia, semelhante a amostra controle (sem aplicação de membrana). O teste sensorial preliminar foi realizado com os pães embalados com as membranas incorporadas com os aromas de alecrim (20%) e gorgonzola. O resultado obtido foi satisfatório, com aprovação por parte dos avaliadores para ambos os aromas.

Palavras-chave: Embalagens ativas, celulose bacteriana, aroma, nanopartículas de prata

ABSTRACT

With the advancement of technology, traditional packaging slowly is losing space, replaced by more sophisticated packaging. In this direction, it increases the development of new materials that, incorporated with certain substances, that have action on the product that are conditioning, not only acting as a physical barrier. An example of this is the active packaging, which allows a reduction of the additives added to the food composition. Among the materials used in these new packages, bacterial cellulose (CB) is proposed, as it has favorable properties for this application, such as high mechanical and tensile strength and the possibility of incorporation of active compounds, besides being biodegradable. In this context, the objective of this work was the chemical and thermal characterization of bacterial cellulose membranes incorporated with rosemary flavor (20% and 100% pure), gorgonzola flavor and silver nanoparticles (NpAg), for application in food packaging aimed at flavoring and antimicrobial action. The CB membranes were synthesized by the bacterium *Gluconacetobacter hansenii*, in static culture and at room temperature for 12 days. After, the membranes were purified and incorporated with the flavors and NpAg by imbibition followed by drying. After the drying step, the membranes were characterized and applied to films of low density polyethylene (LDPE). The characterization was done by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA). FTIR analysis indicated the incorporation of NpAg in the membrane, as well as the flavor of gorgonzola and rosemary20%, different from that with pure rosemary. Thermal stability was decreased at 38.2 °C, 24.2 °C, 1 °C and 13.4 °C for CB/NpAg, CB/Gorgonzola, CB/Rosemary100% and CB/Rosemary20% respectively according TGA analysis. By microbial analysis, according to ASTM E1280, the antimicrobial property for the membranes incorporated with the flavors of rosemary (20% and 100%) and NpAg was confirmed. As for the membrane incorporated with the gorgonzola flavor, there was also no growth, but non-microbial growth was attributed to other substances present used as a vehicle for this flavor. On the other hand, the application of the membranes in the polyethylene films allowed the evaluation of their effectiveness as an antimicrobial system and as a flavoring system, through the Affective Method (acceptance test) in the bread package. Microbial analysis was conducted by visual evaluation of the appearance of filamentous fungi on the surface of the loaves. It was found that breads packed with CB membranes incorporated with rosemary (20%) flavor and NpAg extended to 11 days without mold appearance, differently from the membrane incorporated with the gorgonzola flavor, where the appearance occurred on the 8th day, similar to the control sample (without membrane application). The preliminary sensorial test was performed with the breads packed with membranes incorporated with the flavors of rosemary (20%) and gorgonzola. The result obtained was satisfactory, with approval by the evaluators for both flavors.

Key words: Active packaging, bacterial cellulose, flavor, silver nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da celulose	20
Figura 2. Fluxograma simplificado da metodologia adotada	34
3. Esquema geral de análise para determinação de <i>Salmonella</i>	40
4. Esquema geral de análise para contagem de coliformes	41
5. Formação da membrana de CB na interface líquido-ar por <i>G hansenii</i>	41
6. Imersão das membranas nas soluções para incorporação das substâncias (gorgonzola, alecrim 20% e 100%, NpAg)	44
7. Espectros de FTIR. a) membrana CB e CB/Ag. b) Ag	46
8. Espectros de FTIR. a) membrana CB e CB/gorgonzola. b) gorgonzola	47
9. Espectros de FTIR. a) membrana CB e CB/Alecrim100%. b) Alecrim100%..	49
10. Espectros de FTIR. a) membrana CB e CB/Alecrim 20%.b) Alecrim 20% ..	50
11. Curvas obtidas por TGA para as amostras de CB incorporadas com aromas e antimicrobiano a) curvas TGA. b) curvas 1ª derivada	52
12. 1º dia de acompanhamento visual dos pães embalados afim de verificar aparecimento de fungos filamentosos. a) pão controle, b) pão embalado com membrana de NpAg, c) pão embalado com membranas de aroma de gorgonzola e d) pão embalado com aroma de alecrim 20%.....	58
13. 8º dia de acompanhamento visual dos pães embalados afim de verificar aparecimento de fungos filamentosos. a) pão controle, b) pão embalado com membrana de NpAg, c) pão embalado com membranas de aroma de gorgonzola e d) pão embalado com aroma de alecrim 20%	59
14. 11º dia de acompanhamento visual dos pães embalados afim de verificar aparecimento de fungos filamentosos. a) pão embalado com membrana de NpAg e b) pão embalado com aroma de alecrim20%.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos por TGA para as amostras de celulose bacteriana incorporadas com aromas e antimicrobiano	55
Tabela 2. Resultados crescimento <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Aplicações da celulose bacteriana	22
Quadro 2. Exemplos de sistemas de embalagem ativa e suas aplicações	25
Quadro 3 Exemplos de sistemas de embalagem inteligente e suas aplicações	30

ANEXO

Anexo I. Modelo teste de aceitação preenchido pelos voluntários	68
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB – celulose bacteriana

PET – Poli(tereftalato de etileno)

PEN – Poli(naftalato de etileno)

PVC – Poli(cloreto de vinila)

TGase – enzima transglutaminase

NpAg – nanopartícula de prata

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier

TGA – Análise termogravimétrica

Min - minuto

T_{onset} - temperatura de início de degradação

T_{max} - temperatura máxima de degradação

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE QUADROS	v
LISTA DE ANEXOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
INTRODUÇÃO	16
1. OBJETIVOS	19
1.1 OBJETIVO GERAL	19
1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 CELULOSE	20
2.1.1 Celulose bacteriana	21
2.1.1.1 Vantagens e Desvantagens entre celulose bacteriana e vegetal	21
2.1.1.2 Aplicações celulose bacteriana	22
2.2 EMBALAGENS	23
2.2.1 Funções da embalagem convencional	23
2.2.3 Embalagens ativas	24
2.2.3.1 Sistema antimicrobiano	25
2.2.3.2 Sistema aromático	27
2.2.4 Embalagens inteligentes	29
2.3 NANOTECNOLOGIA	30
2.3.1 Nanotecnologia em embalagens ativas	31
2.3.1.1 Nanopartículas de prata em embalagens ativas	32
2.3.2 Nanotecnologia em embalagens inteligentes	32
3. METODOLOGIA	34
3.1 SÍNTESE DA CB E INCORPORAÇÃO DOS AROMAS	34
3.1.1 Síntese da CB	34
3.1.2 Purificação das membranas de CB	35
3.1.3 Incorporação dos aromatizantes	35

3.2 SÍNTESE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NpAg)	36
3.2.1 Incorporação das NpAg	37
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	37
3.3.1 Espectrofotometria no Infravermelho transformada de fourier (FTIR)	37
3.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)	37
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS MEMBRANAS.....	38
3.4.1 Atividade antimicrobiana das membranas puras	38
3.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas aplicadas nas embalagens de pães	38
3.4.2.1 Presença de <i>Salmonela</i>	39
3.4.2.2 Presença de coliformes a 35 °C	40
3.4.2.3 Fungos	41
3.5 ANÁLISE SENSORIAL PRELIMINAR	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 INCORPORAÇÃO DOS AROMAS POR PROCEDIMENTO <i>IN SITU</i> E <i>EX SITU</i>	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	45
4.2.1 Espectrofotometria no infravermelho transformada de fourier (FTIR)	45
4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)	51
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	56
4.3.1 Atividade antimicrobiana das membranas puras	56
4.3.2 Atividade antimicrobiana das membranas aplicadas nas embalagens de pães	57
4.3.2.1 Coliformes a 35 °C e <i>Salmonela</i>	57
4.3.2.2 Fungos	57
4.4 ANÁLISE SENSORIAL PRELIMINAR.....	59
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

INTRODUÇÃO

Essencialmente, sabe-se que a principal função da embalagem de alimentos é protegê-los os alimentos contra qualquer tipo de deterioração, seja química, física ou microbiológica, desde o acondicionamento até o consumo final. A utilização da embalagem está diretamente ligada ao nosso estilo de vida, tendo uma função adicional tão fundamental que pode ser confundida até mesmo com a do próprio produto. A embalagem é vista como o vendedor silencioso, que tem como função repassar as informações sobre o produto ao consumidor (SOUSA *et al.*, 2012).

No entanto, com toda a modernidade e recursos de aperfeiçoamento encontrados atualmente, lentamente as embalagens tradicionais vem perdendo espaço e os projetos de embalagens estão cada vez mais sofisticados, conciliando conhecimentos de *design*, *marketing*, engenharia e até mesmo psicologia (REBELLO, 2009).

Várias denominações para as inovações em embalagens podem ser encontradas na literatura, com destaque para as embalagens ativas e as inteligentes. As ativas são aquelas que interagem de maneira intencional com o alimento, visando melhorar algumas de suas características e aumentar sua vida de prateleira. Já as inteligentes são aquelas que monitoram as condições do alimento acondicionado comunicando-se com o consumidor (SOARES *et al.*, 2009).

Os principais materiais de embalagens no mercado são: vidro, metal, papel, plástico e madeira. As embalagens de papel representam grande parte destes produtos, que são à base de celulose, um biopolímero abundante, sendo o principal componente da parede celular de plantas. A celulose é um polissacarídeo de cadeia longa composta por anéis de D-glicose unidos por ligações glicosídicas (forma-se pela união de β -glucose através de ligações β -1,4-glicosídicas). A mesma pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários e procariontes (DONINI *et al.*, 2010). A busca do desenvolvimento de novos materiais, seja por meio da inovação ou da necessidade econômica e social, tem contribuído para a descoberta de produtos cada vez mais aliados ao bolso do consumidor e também ao meio ambiente. Neste

sentido, a biotecnologia tem um papel bastante importante. A exemplo disso, os estudos envolvendo a utilização de celulose bacteriana (CB) em diversas áreas, como saúde, alimentos, cosmética, têxtil, acústica e ótica. A CB possui uma característica muito interessante devido ao fato de ser formada integralmente por celulose quando comparada à celulose vegetal, pois esta última apresenta substâncias difíceis de serem separadas como lignina e hemicelulose. Ambas possuem a mesma estrutura química, porém a CB possui uma rede de fibras nanométricas que a confere características diferenciadas quando comparada à vegetal, além de ser permeável, resistente à tração, resiliente e elástica, bem como apresentar baixa toxicidade (RECOUVREUX, 2008).

Diversos micro-organismos são capazes de sintetizar a CB, com destaque para a *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769). Os micro-organismos são inoculados de forma convencional, em meios contendo fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose, hidrolisados de amido, melaço) e nitrogênio (sulfato, cloreto e fosfato de amônio, nitratos, uréia, peptonas). Normalmente, a cultura é desenvolvida em bandejas rasas por um período de 7 a 20 dias, controlando o pH entre 4,0 e 6,5 e a temperatura entre 20 ° e 40 °C, até que uma membrana cubra a superfície do meio de cultivo (DONINI *et al.*, 2010).

A utilização da CB deve ser cada vez mais explorada e inclusa em mais áreas de atuação, pois, um grande destaque é ser biodegradável (ALMEIDA *et al.* 2013). Pensando na atual necessidade do mercado por produtos naturais e com menor concentração de aditivos, se faz necessária, por exemplo, alterações nas formas como os produtos são estocados e transportados. Isso pode ser alcançado por meio de novas tecnologias desenvolvidas para embalagens, de modo que interajam com o produto, influenciando na vida útil deste e que não sejam apenas utilizadas para proteger ou conter o mesmo. A biotecnologia pode se tornar aliada a este novo setor da indústria de alimentos, não necessariamente durante o processo, mas sim acompanhando e agindo sob a vida de prateleira do produto, pois a partir do seu processamento, estocagem até o momento do consumo, o produto pode passar por diversos tipos de deterioração, causadas principalmente por micro-organismos, enzimas e reações com o oxigênio do ar (SOUSA *et al.*, 2012).

Uma alternativa a ser avaliada é uma embalagem composta por CB, com compostos incorporados em sua matriz com ações específicas. Para isso, este trabalho abordou a utilização de CB para aplicação na área de embalagens para alimentos, mais especificamente em embalagens ativas. Foram incorporadas nanopartículas de prata (NpAg), bem como aromatizantes, com a intenção de desenvolver uma embalagem ativa para estender a vida de prateleira de produtos alimentícios, melhorar a qualidade e intensificar suas características sensoriais. Também foi feita a avaliação das propriedades térmicas e físicas do polímero após a incorporação das substâncias.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar membranas de CB incorporadas com NpAg e aromatizantes, visando aplicação em embalagem ativa de produto alimentício, avaliando-as como sistema antimicrobiano e aromático.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Incorporar NpAg na membrana de CB para avaliar eficácia como sistema antimicrobiano;

Incorporar aromas de alecrim e gorgonzola na membrana de CB para avaliar eficácia como sistema aromatizante e antimicrobiano;

Caracterizar as membranas desenvolvidas por análise termogravimétrica (TGA) e Espectrofotometria por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), afim de avaliar a efetividade do método de incorporação das NpAg e dos aromas;

Aplicar a membrana contendo as NpAg e aromatizantes em filmes de poli(cloreto de vinila) (PVC) e avaliar a vida de prateleira de pães caseiros e aplicar a membrana contendo os aromatizantes em filmes de poli(cloreto de vinila) (PVC) e avaliar sua aprovação pelos consumidores por meio do Método Afetivo (Teste de Aceitação) - análise sensorial.

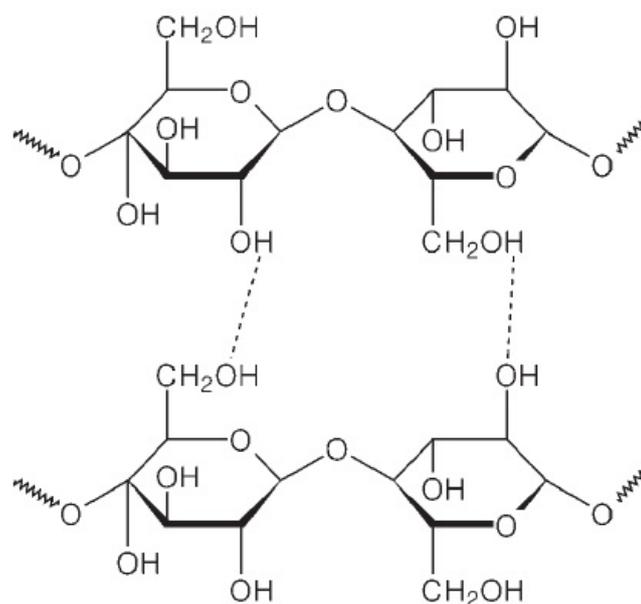
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CELULOSE

A celulose é um composto orgânico abundante no mundo ($C_6H_{10}O_5$), constituindo entre 40 e 50 % das plantas, com uma produção estimada de 10^{14} toneladas por ano, podendo ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários e procariontes, como acontece com algumas bactérias, sendo classificada como celulose bacteriana ou microbiana (DONINI *et al.*, 2010).

A celulose é o principal componente da parede celular das plantas (estando principalmente localizada na parede secundária das células vegetais). Quando utilizada para fins industriais é necessária a remoção de compostos como lignina e hemicelulose, sendo esta etapa cara e de difícil processamento. A figura 1 mostra a estrutura da celulose, onde as linhas pontilhadas esquematizam as pontes de hidrogênio possíveis.

Figura 1: Estrutura da celulose.



Fonte: Recouvreux, 2008.

2.1.1 Celulose Bacteriana (CB)

A CB é produzida por bactérias em meio de cultivo estático ou agitado, sendo que estas necessitam de fontes de carbono, nitrogênio, sais inorgânicos e, se necessário, outros nutrientes como aminoácidos e vitaminas para sua biossíntese. Parâmetros como temperatura e pH do meio devem ser controlados. As bactérias mais estudadas para a produção de CB pertencem aos gêneros *Gluconocetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligeneses*, *Azotobacter*, *Rizobium*, *Sarcina*, dentre outras (CHAWLA *et al.*, 2009).

A CB possui a mesma fórmula química que a celulose vegetal, mas suas fibras em dimensões nanométricas conferem a ela propriedades distintas como: alta cristalinidade (60 a 90 %), força de tensão, elasticidade, durabilidade e elevada capacidade de retenção e absorção de água (99 % de sua massa). É ser inerte metabolicamente, não tóxica e biodegradável, assim como a vegetal (ALMEIDA *et al.*, 2013).

2.1.1.1 Vantagens da CB frente à celulose vegetal

A celulose vegetal, embora seja um polímero amplamente utilizado industrialmente, possui a desvantagem de estar associada a outros compostos como lignina, pectina e hemicelulose que prejudicam sua utilização em fins industriais (BOLDRIN, 2015).

O polímero linear da celulose é fortemente associado devido às pontes de hidrogênio. A formação das fibras do polímero ocorre devido às interações intermoleculares geradas entre as cadeias e as interações intramoleculares garantem a rigidez da estrutura. A fórmula molecular da CB é a mesma da celulose vegetal, porém, suas propriedades físicas e químicas são diferentes. A CB leva vantagem sobre o vegetal, pois pode ser obtida com maior pureza, por possuir maiores graus de polimerização e cristalinidade, maior força de tensão e maior capacidade de armazenamento de água, devido a sua característica hidrofílica, ou seja, possui afinidade com a água. As fibrilas de celulose bacteriana são

aproximadamente 100 vezes mais finas do que a celulose oriunda de plantas (CHAWLA et al., 2009), o que a torna um material altamente poroso com inúmeras aplicações.

2.1.1.2 Aplicações da celulose bacteriana

Conforme Chawla *et al.* (2009), a primeira aplicação da CB foi na área alimentícia na produção de nata de coco, alimento popularmente conhecido nas Filipinas. O mesmo autor também demonstra aplicação na área médica, sendo a CB utilizada na regeneração tecidual e substituição de vasos sanguíneos, além de ser uma barreira física nestes e também estudos na área de engenharia de tecido, fármacos, cosméticos e na remoção de alguns corantes e metais, devido a sua estrutura porosa possibilita ultrafiltração de contaminantes.

No quadro 1 estão apresentadas mais aplicações da CB, demonstrando alta versatilidade e grande importância para a sociedade.

Quadro 1: Aplicações da celulose bacteriana em diferentes áreas.

Área	Aplicação
Cosméticos	Estabilizador de emulsões como cremes tônicos, condicionadores, polidores de unhas.
Indústria Têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos de camping.
Mineração e Refinaria	Esponjas para coleta de vazamento de óleo, materiais para absorção de toxinas.
Tratamento de lixo	Reciclagem de minerais e óleos.
Purificação de esgotos	Purificação de esgotos urbanos, ultrafiltração de água.
Comunicações	Diafragmas para microfones e fones estéreos.
Indústria de Alimentos	Celulose comestível (“nata de coco”).
Indústria de Papel	Substituição artificial de madeira, papéis especiais.
Medicina	Pele artificial temporária para queimaduras e úlceras, componentes de implantes dentários.

Laboratórios	Imobilização de proteínas de células, técnicas cromatográficas, meio para cultura de tecidos
Eletrônica	Materiais opto-eletrônicos (telas de cristal líquido, suporte para OLED).
Energia	Membranas de célula combustível (paládio).

Fonte: DONINI *et al.*, 2010.

Outras possibilidades também abrangem a incorporação de ibuprofeno em membranas para ação anti-inflamatória em dores crônicas (ZANOTI, 2017), biossensores eletroquímicos (SANTOS e ALVES, 2016) e até mesmo em animais na substituição tecidual de córneas em coelhos (SEPÚLVEDA *et al.*, 2016).

2.2 EMBALAGENS

2.2.1 Funções da embalagem convencional

As embalagens convencionais exercem quatro funções básicas: conter, proteger, comunicar e conferir a mínima interação entre a embalagem e o conteúdo durante as etapas de armazenamento e transporte (YAM *et al.*, 2005).

Segundo Kotler & Keller (2006), a embalagem pode ter até três níveis de materiais. A embalagem primária, que envolve diretamente o produto, a embalagem secundária, que o acondiciona e a embalagem de remessa, que visa atender adequadamente as condições de logística do produto.

Limeira (2006) também afirma que a embalagem tem outras funções além das acima citadas, como despertar a atenção pelo material, utilizando, por exemplo, um *design* diferenciado, comunicar os atributos e benefícios do produto, ser coerente com a imagem desejada para o produto e atender aos requisitos legais. Ainda, fornecer orientações sobre a armazenagem do produto em casa, fornecer informações de consumo do produto e fornecer informações sobre o descarte do produto e da embalagem.

Embora as embalagens tradicionais tenham contribuído muito com os primeiros sistemas de distribuição de alimentos, elas não são suficientes para atender às novas exigências dos consumidores por produtos mais próximos ao natural, contendo menos conservantes e que sejam seguros (YAM *et al.*, 2005).

2.2.3 Embalagens ativas

As embalagens ativas têm várias funções adicionais em relação às convencionais. Dentre elas, alteram as condições do produto, desempenhando alguma função após o ponto em que o conteúdo foi embalado (LAGARON, 2005) aumentando sua vida de prateleira, segurança e qualidade, ou ainda melhorando suas características sensoriais (GONTARD, 1997). As principais características das embalagens ativas são a capacidade de absorver oxigênio, etileno, umidade e odor e aquelas que emitem dióxido de carbono, agentes antimicrobianos, antioxidantes e aromas (VERMEIREN *et al.*, 2002). Rooney (1992) também define a embalagem ativa como aquela que exerce algum outro papel na preservação dos alimentos que não o de promover apenas uma barreira inerte.

Segundo Lagaron (2005), nos EUA, Japão e Austrália o conceito de embalagem ativa está sendo aplicado com sucesso, porém ainda existem alguns fatores, como não atendimento à legislação vigente, resistência dos consumidores e conhecimento sobre os impactos socioeconômicos e ambientais, que ainda não são muito conhecidos.

As primeiras patentes de embalagens ativas surgiram na década de 80 no Japão e EUA, sendo aplicada inicialmente na indústria farmacêutica com adesivos que liberam doses gradativas de medicamento através da pele, como repositores de hormônio, por exemplo. Outros exemplos de aplicação também podem ser mencionados como controle de trocas gasosas com o ambiente no caso de alimentos frescos, controle da entrada de O₂ no caso de alimentos oxidáveis, controle de transferência de umidade no caso de alto índice de umidade relativa entre os alimentos e o ambiente, retenção de aditivos promovendo uma resposta funcional mais significativa na superfície dos produtos (REBELLO, 2009). No Quadro 2 estão apresentadas algumas aplicações das embalagens ativas.

Quadro 2: Exemplos de sistemas de embalagens ativas e aplicações.

Embalagens ativas	Principais componentes	Aplicações
Absorvedora de oxigênio	Pós de ferro, ácido ascórbico, compostos organometálicos, glicose-oxidase, etanoloxidase	Produtos de panificação, café, chá, leite em pó, queijos, produtos cárneos
Absorvedora de etileno	Permanganato de potássio, carvão ativado, sílica gel, zeólito, argila	Frutas e hortaliças
Absorvedora de umidade	Propilenoglicol, poli (álcool vinílico), sílica gel, terra diatomácea, argila	Frutas, vegetais, produtos congelados e de panificação
Absorvedora de dióxido de carbono	Hidróxido de cálcio + hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, óxido de cálcio e sílica gel	Café torrado, produtos desidratados
Emissoras de etanol	Etanol	Produtos de panificação, peixe
Liberadoras e conservantes antimicrobianos	Sorbatos, benzoatos, propionatos, etanol, ozônio, peróxido, dióxido de enxofre, antibióticos, zeólito de prata, enzimas	Carne, peixe, queijo, frutas secas e produtos de panificação
Emissoras de dióxido de carbono	Ácido ascórbico, carbonato de ferro + haleto metálico	Frutas e hortaliças, peixes, carnes e aves

Fonte: Braga e Peres, 2010.

2.2.3.1 Sistemas antimicrobianos

Baseiam-se na incorporação de conservantes na estrutura polimérica para inibir ou retardar o crescimento da microbiota presente principalmente na superfície do alimento embalado, permitindo a redução do teor de conservantes neste, atendendo à nova tendência dos consumidores em busca de alimentos com o mínimo possível de aditivos (BRAGA & PERES, 2010).

As embalagens antimicrobianas podem ser divididas em dois grupos, em um onde o agente antimicrobiano migra da embalagem para o produto, em que os agentes efetivos contra o crescimento microbiano permanecem na superfície da embalagem sem a necessidade de migração para o produto.

Os agentes antimicrobianos com maior potencial são os sais de prata, usados como aditivos de polímeros principalmente na área de alimentos no Japão. O Ag-zeólito é constituído de cristais de alumino-silicatos com elementos das primeira e segunda família de metais da tabela periódica. A incorporação de Ag-zeólito deve ser em nível de 1–3 % na estrutura polimérica e sua efetividade depende do contato direto com os micro-organismos (APPENDINI & HOTCHKISS, 2002).

Battisti (2016) desenvolveu folhas celulósicas com revestimento biodegradável contendo gelatina, enzima TGase, glicerol e ácido cítrico para ações antimicrobiana e antioxidante para uso como embalagem ativa em carne bovina fresca. Os revestimentos ativos presentes proporcionaram uma menor carga microbiológica para as carnes embaladas, confirmado pelos valores de pH, além de sustentarem a coloração vermelha (desejável) da carne por um maior período de tempo. As carnes embaladas nos papéis ativos mostraram ainda estarem menos susceptíveis à oxidação lipídica e perda de umidade durante o período de armazenamento, o que leva a inferir que estes atuaram de forma positiva no controle e na manutenção das propriedades desejáveis da carne.

Michels (2016) avaliou o efeito inibitório de nanopartículas de prata na atividade de bactérias oxidadoras de amônia e confirmou esta inibição. Concluiu que a inibição gerada por nanopartículas de prata e seus respectivos íons aumenta com o aumento de sua concentração.

Marchiore (2015) avaliou a difusão de prata em salsichas recobertas com filmes comestíveis de amido contendo nanopartículas antimicrobianas e concluiu que não ocorreu crescimento de bactérias ácido lácticas com as salsichas

recobertas com nanopartículas de prata. Portanto, houve controle do crescimento bacteriano e também não houve oxidação lipídica e proteica quando comparado com a amostra controle.

Santiago-Silva *et al.* (2009) avaliaram a eficiência antimicrobiana de filmes de celulose incorporados com pediocina (ALTA 2551) na conservação de presunto fatiado. Os filmes foram testados contra *Listeria innocua* e *Salmonella choleraesuis* e mostraram-se mais eficientes na inibição de *L. innocua*, tendo reduzido o seu crescimento em até dois ciclos logarítmicos em relação ao tratamento controle após 15 dias de estocagem.

Um sachê antimicrobiano contendo alil-isotiocinato inibiu o crescimento de fungos filamentosos e leveduras e *Staphylococcus aureus* em queijo mussarela fatiado, estocado a 10 °C por 12 dias (PIRES, 2006). O mesmo sachê também foi capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* em amendoim em grãos (SILVA, 2008b).

Pires *et al.* (2008b) utilizaram filmes de celulose incorporados com nisina e natamicina para aumentar a vida de prateleira de queijo mussarela fatiado e observaram eficácia dos filmes, principalmente, sobre fungos filamentosos e leveduras.

Incorporação de montmorilonita e lactato de sódio em filmes foram eficientes contra *L. monocytogenes*, reduzindo um ciclo logarítmico na carne bovina fresca após cinco dias de armazenamento a 10 °C (SOARES *et al.*, 2007).

Camilloto *et al.* (2007) desenvolveram filme poliolefínico incorporado com triclosan (2,4,4'-triclóro-2'-hidroxidifenil-eter) para conservação de presunto fatiado. Os presuntos acondicionados nos filmes antimicrobianos apresentaram redução de 1,5 ciclo logarítmico para *Escherichia coli* e *S. aureus* em comparação com presunto embalado com filme controle após 12 dias de estocagem.

2.2.3.2 Sistemas aromáticos

Os sistemas aromáticos são muito atrativos, principalmente, pela melhoria da aceitação sensorial dos produtos acondicionados. As embalagens com estes sistemas são produzidas pela incorporação de aromas voláteis na matriz polimérica (HUBER *et al.*, 2002). A volatilidade de um aroma está diretamente ligada à massa molar dos componentes. Outra aplicação da embalagem

aromática é para minimizar um fenômeno chamado *scalping*, ou seja, sorção de aromas dos alimentos pelos materiais poliméricos das embalagens, que resultam na mudança do perfil sensorial. Essas embalagens têm demonstrado excelentes propriedades para aplicações em produtos de panificação, biscoitos, vegetais frescos e cereais (MARKARIAN, 2006).

Pires *et al.* (2008a) pensando em incentivar o consumo de leite fluido, desenvolveram sachês contendo aromas que foram incorporados no interior das embalagens de leites integral e desnatado. Os autores avaliaram sensorialmente o novo produto e os resultados demonstraram maior aceitação para amostras de leites integrais e desnatado com aroma de coco. Realizaram análises microbiológicas e físico-químicas das amostras e evidenciaram que o produto não sofreu alterações quanto às suas características. Concluíram que os sachês aromáticos tem grande potencial para serem usados em um sistema de embalagem ativa para o leite fluido, aumentando a aceitação do produto.

A aromatização de presunto por embalagem ativa foi avaliada por Pereira *et al.* (2008b). Os autores desenvolveram filmes incorporados com aromas de alho, limão e pizza, os quais foram colocados em contato com o presunto e avaliaram a aceitação global do produto após quatro dias de estocagem. Verificaram que o presunto acondicionado na embalagem aromatizada com alho teve aceitação similar ao presunto original, podendo ser utilizada para se obter um produto diferenciado, com boa inserção no mercado consumidor.

Silva *et al.* (2008a) desenvolveram e avaliaram embalagens incorporadas com diferentes níveis (0, 15, 30 e 45 %) de aroma de fumaça para salsicha. Na análise sensorial, realizada cinco dias após a embalagem das salsichas nos filmes aromáticos, foi observada maior aceitação do produto, com relação ao atributo sabor, para as amostras com 30 e 45 % de aroma de fumaça. Análises microbiológicas mostraram ainda que os filmes inibiram o desenvolvimento da microbiota do produto, sendo a maior atividade detectada nas concentrações de 15 e 30 %. Os autores concluíram que a utilização de embalagem ativa aromática possibilita ao mercado consumidor produtos diferenciados e com qualidade.

A aceitação sensorial de manteiga embalada em filmes aromáticos incorporados com óleos essenciais de manjeriço, menta e alho foi pesquisada por Medeiros *et al.* (2008). Cem provadores avaliaram o sabor da manteiga aromatizada nos períodos de 15 e 60 dias de armazenamento, utilizando uma

escala hedônica de nove pontos. Os autores verificaram que as amostras com aroma de manjericão e alho apresentaram aceitação similar ao controle (manteiga sem aroma), produto com ótima aceitação no mercado. Portanto, as manteigas aromatizadas com óleo essencial de manjericão e alho apresentam potencial para serem introduzidas no mercado consumidor do produto.

Pereira *et al.* (2008a) desenvolveram uma solução filmogênica ativa, incorporada com café torrado e moído, com e sem adição de aroma de café tradicional e a aplicaram em pazinhas, que foram avaliadas para consumo de sorvete de base neutra. A pazinha revestida com solução filmogênica adicionada de aroma de café tradicional foi a que apresentou maior média de aceitação entre os consumidores, ficando alocada entre os termos gostei moderadamente e gostei muito. Os resultados apontaram o potencial desse novo produto diante da indústria de gelados.

Filmes laminados ativos incorporados com aromas de tangerina, mamão e banana foram desenvolvidos por Espitia *et al.* (2008) e utilizados para embalar barras de chocolate branco. O produto foi avaliado quanto à aceitação do sabor, e os dados analisados por meio de Mapa de Preferência Interno. Os resultados indicaram que o chocolate embalado com o filme aromático de tangerina apresentou melhor aceitação, similar ao tratamento controle (filme sem aroma). Logo, o filme aromático de tangerina tem potencial de aplicação para obtenção de um produto diferenciado.

2.2.4 Embalagens inteligentes

Segundo Braga & Peres (2010), a embalagem inteligente tem como função proteger o produto, interagir com o mesmo e responder a mudanças específicas do alimento ou do ambiente que o cerca, tendo sensores e indicadores que sinalizam o resultado dessa medição.

Os sensores são constituídos de receptores e transdutores, em que o primeiro exerce a função de transformar informações físicas e químicas em energia, que pode ser medida pelo transdutor. Outra forma é através do indicador, que pode ser definido como a substância que indica a presença ou ausência de um outro composto, ou o grau de reação entre duas ou mais substâncias por meio de mudanças de suas características, especialmente a cor. Este método indicador

é bastante interessante, pois a leitura é realizada de forma direta, rápida, mediante mudança visual (BRAGA & PERES, 2010).

Esse sistema pode ser composto por rótulos, etiquetas ou filmes que proporcionam maiores possibilidades de monitoramento da qualidade do assegurado. É a forma mais simples de fornecer as informações sobre a qualidade do produto nela embalado durante as etapas de transporte e acondicionamento, permitindo que o consumidor tenha acesso as reais condições do produto no momento da compra (SOARES *et al.*, 2009). O Quadro 3 demonstra sistemas e aplicações da embalagem inteligente.

Quadro 3: Exemplos de sistemas de embalagens inteligentes e aplicações.

Embalagens Inteligentes	Principais Componentes	Aplicações
Indicadoras de crescimento de micro-organismos	Corantes de pH, todos os tipos de corantes que reagem com metabólitos (voláteis e não voláteis)	Alimentos perecíveis (peixes, carnes e aves)
Indicadoras de oxigênio	Tintas redox, enzimáticos, corantes de pH	Alimentos estocados em baixas concentrações de oxigênio
Indicadoras de dióxido de carbono	Químicos	Embalagens de alimentos com atmosfera modificada ou controlada
Indicadoras de tempo-temperatura	Mecânicos, químicos e enzimáticos	Alimentos congelados e refrigerados
Indicadoras patogênicos	Vários métodos químicos e imunoquímicos reagem com toxina	Alimentos perecíveis como carnes, peixes e aves

Fonte: BRAGA & PERES, 2010.

2.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia amplia a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, sendo de um a

cem nanômetros. Partículas deste tamanho, ou “nanopartículas”, apresentam uma grande área superficial e, geralmente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (QUINA, 2004).

Muitas são as áreas que foram, estão ou estarão envolvidas em nanotecnologia, entre elas a medicina, a biologia, a farmacologia e os materiais e, neste campo, todas as aplicações nas áreas da engenharia, como construção civil, eletrônica, mecânica e química, entre outras (PEREZ *et al*, 2012). E como não poderia ser diferente, o setor de alimentos também tem se destacado nas pesquisas em nanotecnologia, visando principalmente garantir o abastecimento alimentar mediante ao aumento populacional observado e estimado para os próximos anos e as variações de caráter ambiental, tanto dos fatores climáticos quanto do uso sustentável dos recursos naturais. Diversas empresas de grande porte do setor alimentício, como a Heinz, a Kraft Foods e a Nestlé, tem apoiado estudos envolvendo o uso de nanotecnologia na produção de alimentos e bebidas (GREINER, 2009).

2.3.1 Nanotecnologia em embalagens ativas

Materiais de embalagem de alimentos tem maior espaço nas aplicações da nanotecnologia para o setor alimentício. Muitos autores têm afirmado que os principais desenvolvimentos na área de embalagens aplicando a nanotecnologia incluem (LEI *et al.*, 2006; GREINER, 2009; CHAUDHRY *et al.*, 2010):

- Incorporação de nanomateriais que melhoram as propriedades de embalagens (flexibilidade, propriedades de barreira a gases, temperatura / umidade estabilidade);

- Embalagens ativas contendo nanopartículas de óxido metálico ou de metal (por exemplo, prata, óxido de zinco, óxido de magnésio) com propriedades antimicrobianas;

- Nanorevestimentos como embalagens com propriedades antimicrobianas ou de barreira e para superfícies de auto-limpeza, em instalações de processamento de alimentos.

A Bayer Polímeros desenvolveu um filme para embalagens, o Duretano KU2- 2601, que é mais transparente e resistente do que os outros disponíveis no mercado. Esse produto é enriquecido com um enorme número de nanopartículas de silicatos que reduz muito a entrada de oxigênio e de outros gases, assim como a saída da umidade, prevenindo a deterioração do alimento (MARTINS *et al.*, 2008).

A Kodak também desenvolveu um filme especial antimicrobiano, que tem a capacidade de absorver oxigênio do alimento, impedindo que o alimento se deteriore (MARTINS *et al.*, 2008).

2.3.1.1 Nanopartículas de prata em embalagens ativas

Outros exemplos incluem embalagens para alimentos feitas de plástico e NpAg, desenvolvidas com base na ação antimicrobiana das NpAg, um número de embalagens ativas foram desenvolvidas para preservar os materiais dentro dos alimentos, inibindo o crescimento microbiano. NpAg também foram incorporadas na superfície interna de refrigeradores domésticos (LG, Samsung e Daewoo) para evitar crescimento microbiano e manter um ambiente limpo e higiênico na geladeira (GREINER, 2009).

2.3.2 Nanotecnologia em embalagens inteligentes

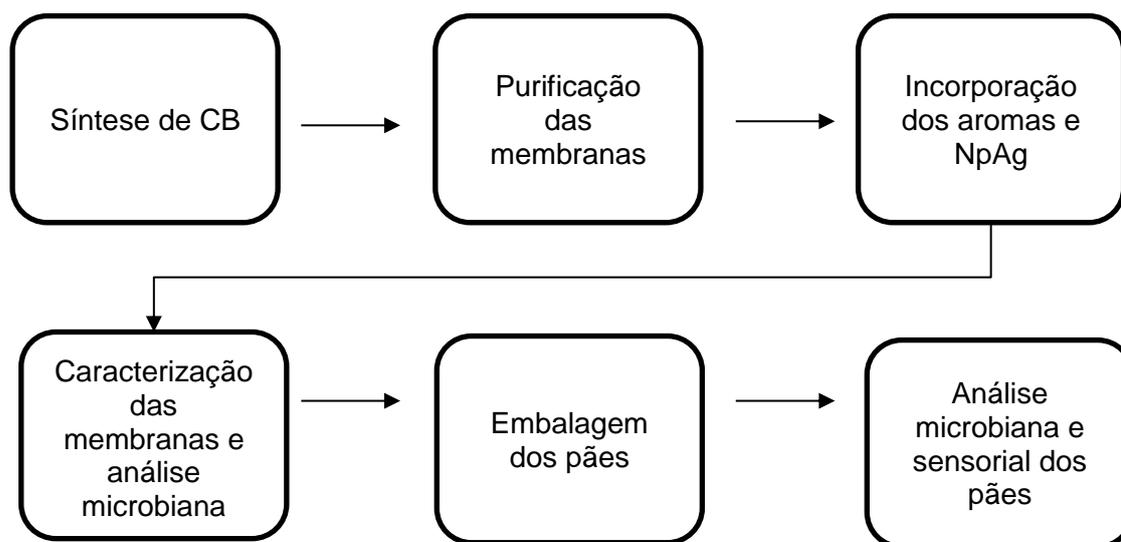
Na área de embalagens inteligentes, o objetivo principal de nanosensores é reduzir o tempo para a detecção de patógenos de dias para horas ou até mesmo minutos. Os nanosensores podem ser colocados diretamente no material de embalagem, onde seriam como “língua eletrônica” ou “nariz” para detecção de substâncias químicas liberadas durante a deterioração dos alimentos (SOZER e KOKINI, 2009). A empresa AgroMicron desenvolveu um *spray* nanoluminescente que contém uma proteína que indica a presença de micro-organismos como a *Salmonella*. No contato do micro-organismo com o *spray*, desenvolve-se um brilho característico. Quanto maior o brilho, maior a contaminação. Dentro da mesma estratégia, pesquisadores americanos desenvolveram um nanosensor portátil para detectar produtos químicos, patógenos e toxinas em alimentos. Dessa forma,

os alimentos poderão ser analisados sem o envio de amostra para laboratórios tornam caras e demoradas (MARTINS *et al.*, 2008), contribuindo assim para uma maior segurança dos alimentos e conseqüentemente dos consumidores.

3 METODOLOGIA

Para melhor compreensão da metodologia adotada, pode-se observar um fluxograma simplificado na figura 2 e nos tópicos posteriores o detalhamento de cada etapa.

Figura 2: Fluxograma simplificado da metodologia adotada



3.1 SÍNTESE DE CELULOSE BACTERIANA E INCORPORAÇÃO DOS AROMAS

3.1.1 Síntese de CB

Membranas de CB foram sintetizadas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, da linhagem ATCC 23769. Foram preparados frascos de *Erlenmeyer* com 125 mL de meio de cultivo contendo manitol (20 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e um *vial* de *Gluconacetobacter hansenii*, sendo a cultura mantida estática, sob temperatura ambiente durante o período de 12 dias. Cada *vial* continha 500 µL de suspensão de *Gluconacetobacter hansenii* e 500 µL de glicerol a 40 % congelado em -80 °C.

3.1.2 Purificação das membranas de CB

Submeteu-se as membranas a cinco trocas de água destilada durante três dias. Após as trocas de água, as membranas foram aquecidas em água destilada a 80 °C por 50 min em banho-maria. Em seguida, para a remoção das bactérias, tratou-se as membranas com solução a 0,1 M de NaOH, em banho-maria, a 80 °C por 50 min e então, foram lavadas novamente com água destilada até atingir pH 7,0.

Após a purificação, as membranas foram incorporadas com os aromas de alecrim e gorgonzola e as nanopartículas de prata (NpAg), conforme descrito nos itens 3.1.3.

3.1.3 Incorporação dos aromatizantes

Foram realizados dois procedimentos para a incorporação dos aromas:

a. Procedimento *in situ*: no processo de cultivo do micro-organismo e formação da membrana, acrescentou-se ao meio os aromas de alecrim, gorgonzola e quatro queijos nas concentrações de 0,5 %, 1 %, 3 % e 5 % (V/V).

b. Procedimento *ex situ* (embebição): as membranas foram imersas em 5 mL dos aromas de alecrim (20 % e 100%) e gorgonzola, quantidade suficiente para cobrir toda a membrana e deixadas por 24 h, sendo viradas a cada 1 h durante 12 h.

Após esse período, as membranas foram levadas para secagem ainda dentro das soluções em estufa a 30 °C por 24 h, com o cuidado para que não ficassem grudadas nas placas de Petri.

Composição dos aromas segundo rótulos:

- Alecrim 100%: composição 100 % óleo de alecrim;
- Gorgonzola: composição 75 % propilenoglicol e 25 % compostos aromáticos;
- Quatro queijos: composição 80 % amido de milho e 20% compostos aromáticos;
- Alecrim 20%: composição 80 % álcool e água e 20 % óleo de alecrim.

Os aromas foram adquiridos em estabelecimentos do ramo alimentício.

3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NpAg)

A dispersão de NpAg a 100 ppm foi gentilmente fornecida pelo professor André Lourenço Nogueira (UNIVILLE).

As nanopartículas de prata foram preparadas utilizando-se nitrato de prata (AgNO_3) (pureza > 99 %) como sal precursor, aminoetil-aminopropil-trimetoxissilano (AES), como agente estabilizante e boridreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor da reação de síntese. Todos os reagentes foram utilizados conforme recebidos, sem purificação prévia. Inicialmente, o AgNO_3 (0,0157 g) e o AES (10,8 mmol/L) foram adicionados em água deionizada (90 mL) e mantidos sob agitação por 48 h.

As sínteses foram conduzidas sob agitação constante, aproximadamente, 600 rpm e temperatura de 20 °C em um reator de 100 mL de vidro boro-silicato encamisado conectado a um banho termocriostático capaz de controlar a temperatura do meio reacional. A solução de NaBH_4 (10 mL com concentração de 0,46 mmol/L), preparada no momento da síntese e mantida em banho de gelo, foi adicionada à solução de nitrato de prata e estabilizante (AES) a uma vazão de aproximadamente 1 mL/min por meio de uma bureta graduada de vidro. Após o término da dosagem da solução do agente redutor, o sistema foi mantido sob agitação por mais 30 min para garantir reação completa.

Os fornecedores dos reagentes são:

- Nitrato de prata (AgNO_3): Cennabras;
- Boridreto de sódio (NaBH_4): Dinâmica;
- Aminoetil-aminopropil-trimetoxissilano (AES): Xiameter OFS 6020 da Dow Química.

3.2.1 Incorporação das NpAg

Após o processo de cultivo dos micro-organismos e formação das membranas, utilizou-se o procedimento *ex situ* (embebição) para a incorporação dos antimicrobianos. O excesso de água das membranas foi removido manualmente. Em seguida, a membrana foi embebida em meio aquoso (100 mL) contendo 5 mL da solução de NpAg a 100 ppm e mantida por 24 h, sendo virada a cada 1 h.

Em seguida, as membranas foram secas em estufa a 30 °C, com o cuidado para que não ficassem grudadas nas placas de Petri.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas de CB incorporadas (*ex situ*) com os aromas de alecrim, gorgonzola e NpAg foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA).

3.3.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos funcionais dos polímeros foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), em equipamento da Perkin Elmer Frontier. Realizou-se 16 varreduras por amostra, de 650 a 4000 cm^{-1} , no modo de refletância total atenuada (ATR), com elemento de seleneto de zinco.

3.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram realizadas para verificar a degradação térmica e a perda de massa e determinar a estabilidade térmica dos polímeros obtidos. Determinou-se a temperatura de início de degradação (T_{onset}) e a temperatura máxima de degradação (T_{max}). As análises foram realizadas em equipamento da TA Instruments modelo TGA-Q50. As amostras foram aquecidas de 25 a 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS MEMBRANAS

3.4.1 Atividade antimicrobiana das membranas puras

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados conforme descrito na norma ASTM E2180.

Preparou-se um meio de cultivo para cada micro-organismo (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) contendo 50 mL de água destilada e 1,5 g de caldo soja tripticaseína (TSB). Os frascos após autoclavados foram inoculados e incubados por 18 h a 30 °C e 150 rpm. Após as 18 h, ajustou-se a cultura em espectrofotômetro (comprimento de onda de 475 nm) até atingir $1-5 \times 10^8$ células/mL (densidade óptica de 0,28) diluindo-a com água estéril. Assim, transferiu-se 1 mL dessa suspensão de células já ajustadas para um erlenmeyer contendo agar *slurry* (100 mL de água, 0,28 g de NaCl e 0,30 g de agar-agar)

As membranas contendo alecrim (20% e 100%), gorgonzola, NpAg e controle foram cortadas em quadrados de 3 x 3 cm e colocadas em placas de Petri estéreis e expostas a luz UV por 15 min de cada lado da membrana, afim de eliminar micro-organismos presentes. Com o auxílio de um *swab* as membranas foram umedecidas com solução salina (0,85 % NaCl + água destilada). Sobre essas membranas foi adicionado 1 mL do agar *slurry* com o micro-organismo e incubado em estufa a 35 °C por 24 h.

Após o período de incubação, transferiu-se cada membrana para um frasco de *Erlenmeyer* contendo 100 mL de solução salina. O *Erlenmeyer* contendo a membrana foi levado para um banho ultrassônico e deixado por 1 min. Em seguida, mais um minuto no vórtex (180 m^{-1}). Assim, as células impregnadas na membrana se desprenderam e migraram para a solução.

Essa solução de células passou por mais três diluições em tubos de ensaio contendo solução salina, obtendo-se os fatores de diluição de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Foi retirado 0,1 mL de cada tubo e aplicou-se a técnica de espalhamento em placas de Petri estéreis contendo meio TSB + agar e deixado por 24 h em estufa a 35 °C.

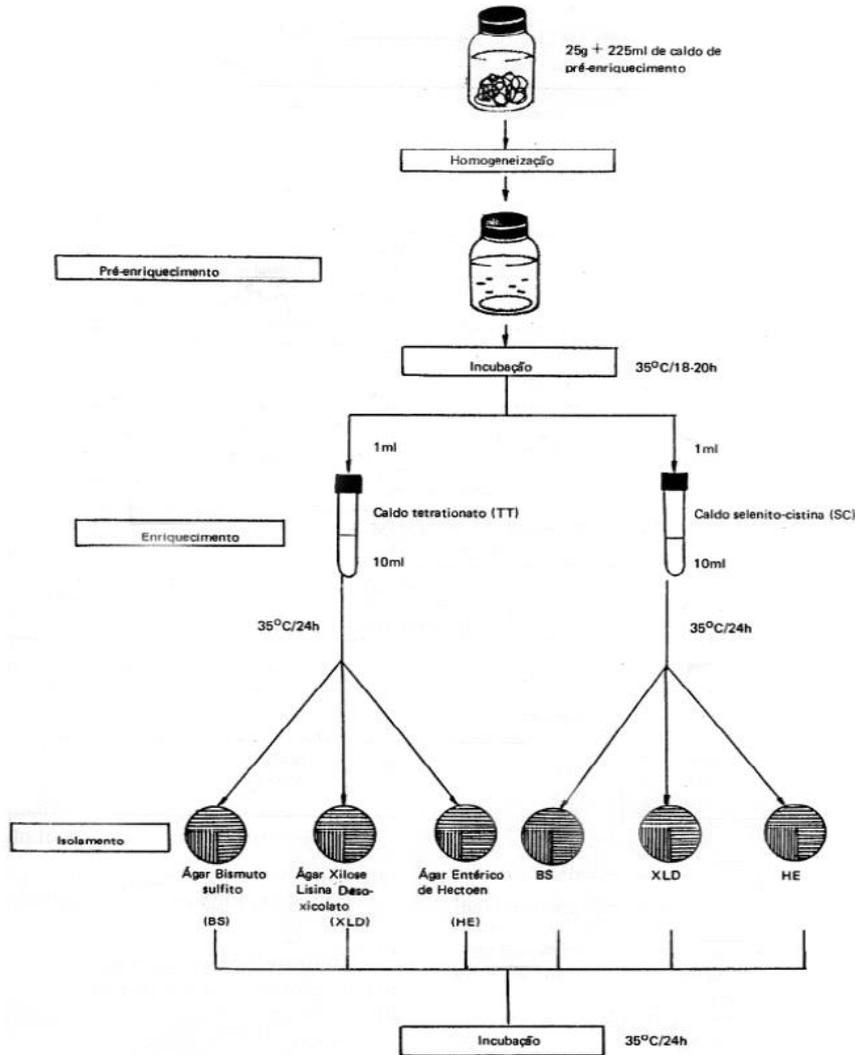
3.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas aplicadas nas embalagens de pães

As membranas incorporadas com aromas de alecrim 20%, gorgonzola e NpAg foram expostas por 15 min à luz UV em fluxo laminar para esterilização. Em seguida, foram colocadas em filmes de poli(cloreto de vinila) (PVC), tal como uma "etiqueta" no filme, em contato direto com o pão e sem contato com o ar externo e, então, embalou-se os pães. Após o fim da validade dos pães, estabelecido pelo fornecedor, os pães embalados mais a amostra controle (apenas filme de PVC) foram analisados quanto a *Salmonella* e coliformes a 35 °C, no laboratório de Microbiologia da Univille, a fim de seguirem para análise sensorial.

3.4.2.1 Presença de *Salmonella*

A verificação da presença de *Salmonella* seguiu duas etapas: pré-enriquecimento (caldo lactosado) e enriquecimento seletivo (caldo tetracionato e *Salmonella* enriquecimento). O teste segue com o plaqueamento pela técnica do *spread plate* nos meios seletivos. No caso em questão foram utilizados os meios SS (*Salmonella Shigella*) e XLD (Ágar Xilose Lisina Desoxicolato). O esquema do método completo pode ser visualizado na figura 3.

Figura 3: Esquema geral de análise para determinação de *Salmonella*



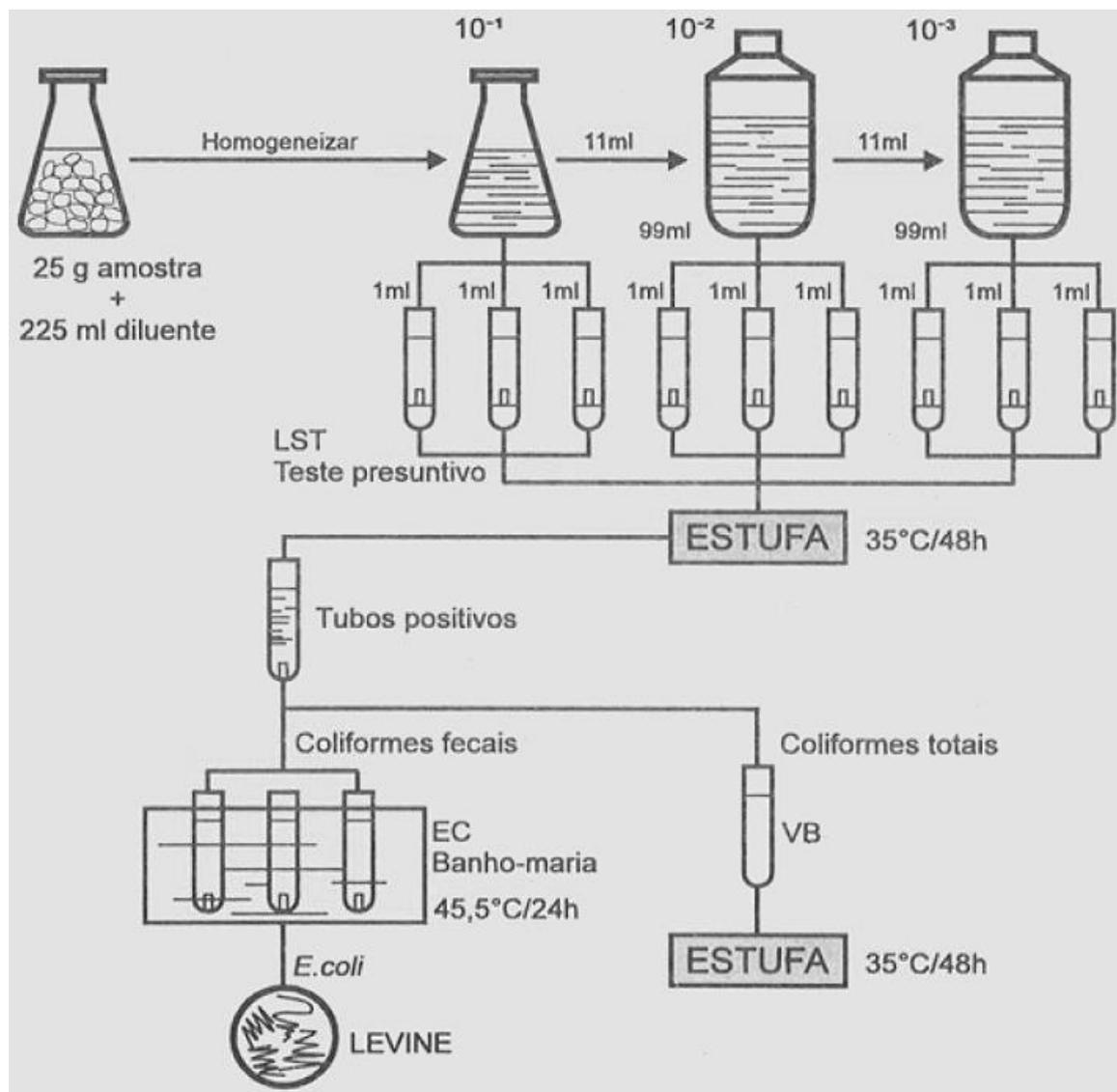
3.4.2.2 Presença de Coliformes a 35 °C

Cada amostra de pão (25g) foi transferida para um *Erlenmeyer* esterilizado contendo 225 mL de uma solução salina 0,9% e o material foi homogeneizado. Esta diluição foi considerada 10^{-1} . Em seguida 1 mL desta diluição foi adicionada em 9 mL de H₂O salina peptonada (sp) sendo a diluição 10^{-2} e assim até a diluição 10^{-3} (SILVA *et al.*, 2010).

Partindo das amostras já diluídas, foi feita a determinação de coliformes a 35 °C seguindo a técnica do NMP com três séries de 3 tubos. Foi pipetado 1 mL das amostras diluídas e adicionado em tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo lactosado (contendo 0,001% de púrpura de bromocresol) e tubos Duhran

invertidos. Caso resultados positivos (teste presuntivo), evidenciados pela presença de gás e abaixamento do pH (cor amarela), se deu continuidade ao teste. O esquema do método completo pode ser visualizado na figura 4.

Figura 4: Esquema geral de análise para contagem de Coliformes



3.4.2.3 Fungos

Os pães foram avaliados visualmente ao longo de 11 dias, ou seja, até observar o aparecimento de fungos filamentosos. Os mesmos permaneceram embalados todo o tempo, sob temperatura ambiente com registro fotográfico diário até o fim do teste. A avaliação a respeito de fungos se deu apenas de forma visual, pois a RDC 12/2001 Padrões Microbiológicos de Alimentos, legislação nacional

que trata de aspectos microbiológicos em alimentos, especifica limites apenas para *Salmonella* (ausência/25 g) e Coliformes a 45 °C (100 UFC/g) em pães.

3.5 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial preliminar foi realizada através do método afetivo (teste de aceitação), com cinco voluntários, possuindo características diferenciadas (sexo, posição social, treinamentos ou não em análise sensorial, idade e frequência de consumo).

Teve como objetivo avaliar o quanto os voluntários gostaram das amostras de pães embalados com alecrim 20 % e gorgonzola, preenchendo o formulário constante do Anexo I. As amostras foram avaliadas individualmente e codificadas com "Amostra 1 - Alecrim" e "Amostra 2 - Gorgonzola", sendo servidas em prato de polietileno descartável, com um copo de água a temperatura ambiente e biscoito de água e sal, juntamente com o formulário, onde foi avaliado o quanto o avaliador gostou ou desgostou das amostras oferecidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E INCORPORAÇÃO DE AROMAS POR PROCEDIMENTO *IN SITU* E *EX SITU*

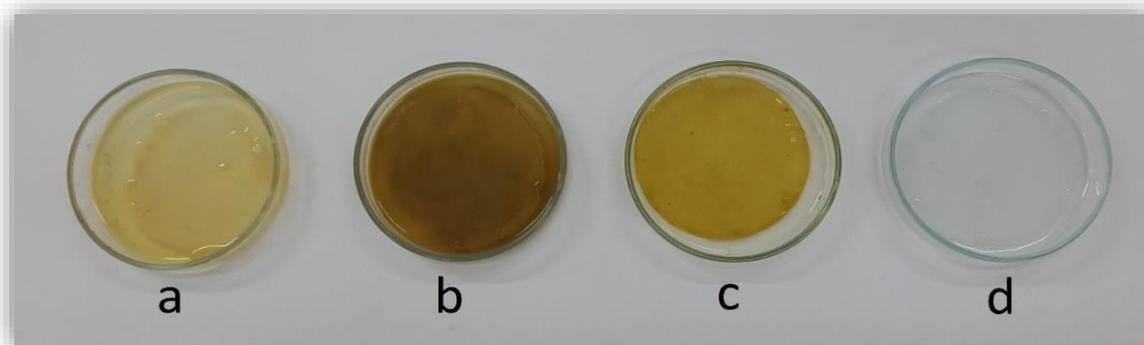
G. hansenii é uma bactéria estritamente aeróbica, conhecida por produzir celulose na forma de uma película na interface líquido-ar do meio de cultivo, em cultura estática (MOHITE & PATIL, 2014). Para a bactéria, a CB funciona como mecanismo de flotação, permitindo ao micro-organismo permanecer em uma interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. A figura 5 apresenta a formação das membranas na interface líquido-ar do meio de cultivo controle ou que foram destinadas ao procedimento *ex situ* de incorporação.

Figura 5 - Formação da membrana de CB na interface líquido-ar, por *G. hansenii*.



As membranas formadas sem a adição dos aromas, decorrido os 12 dias, passaram por um processo de purificação antes da incorporação *ex situ*. A figura 6 demonstra as membranas durante o processo de incorporação dos aromas e NpAg.

Figura 6 - Imersão das membranas nas soluções para incorporação das substâncias a) gorgonzola, b) alecrim20 %, c) NpAg, d) alecrim100%.



A incorporação da dispersão de prata coloidal pelas membranas deu-se de forma rápida e muito eficaz, com duração de cerca de 4 horas. Já as incorporações de gorgonzola e alecrim, por se tratarem de um óleo, ocorreram de forma mais lenta, em torno de 7 horas, assim como o procedimento de secagem também foi mais demorado. As colorações diferem provavelmente devido à composição dos compostos utilizados no aromas e NpAg. As colorações de todas as membranas permaneceram as mesmas após secagem, porém com menos intensidade.

Diferentemente do processo de formação da membrana controle, durante o procedimento *in situ* de incorporação dos aromas, as células não conseguiram formar o biopolímero, formando apenas um precipitado no fundo do frasco, como ocorreu com o aroma de quatro queijos, sem nenhuma formação de membrana. Isto pode ter ocorrido, provavelmente, porque os aromas de alecrim e de gorgonzola são oleosos e apresentam características hidrofóbicas que não possibilitam mistura homogênea com o meio de cultivo. Também por serem menos densos que a água, esses aromas ficaram na superfície do meio, impedindo assim, o contato direto da bactéria com o ar, como observado por Hammer *et al.*, (1999). Ainda o alecrim, mesmo em baixas concentrações, apresenta ação antimicrobiana, impedindo a bactéria de se desenvolver no meio e, conseqüentemente, não ocorrendo a formação das membranas de CB (RIBEIRO *et al.* 2011).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.2.1 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

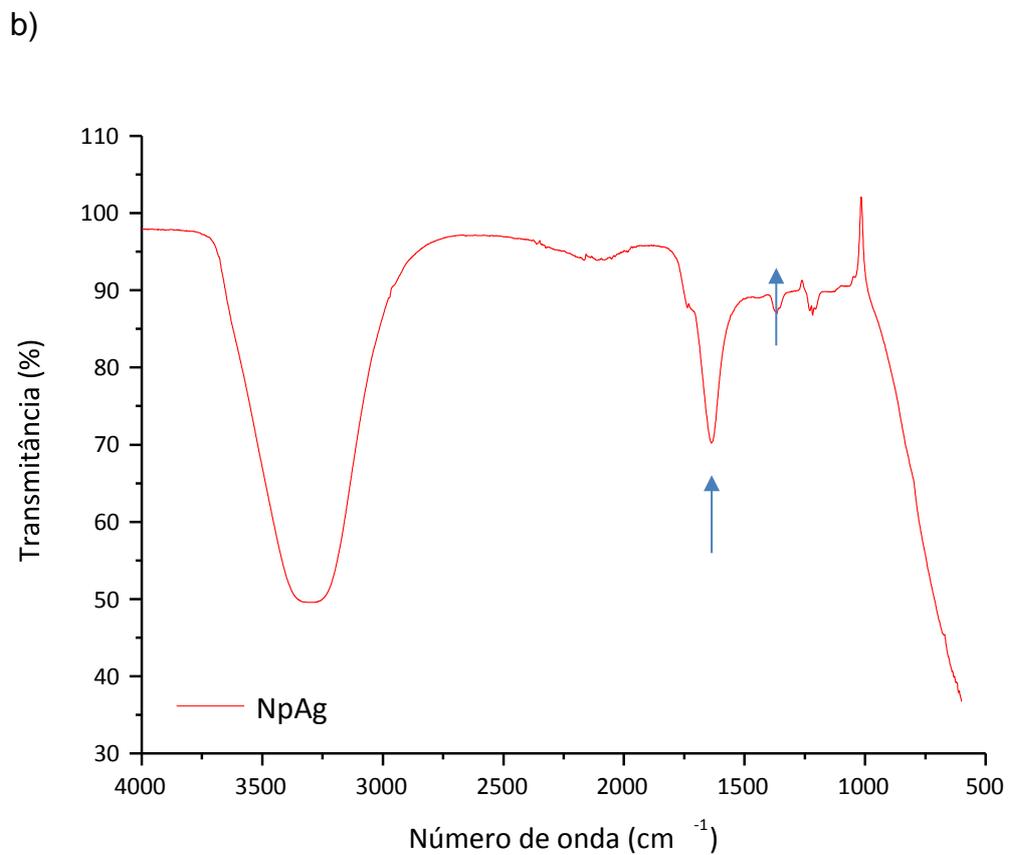
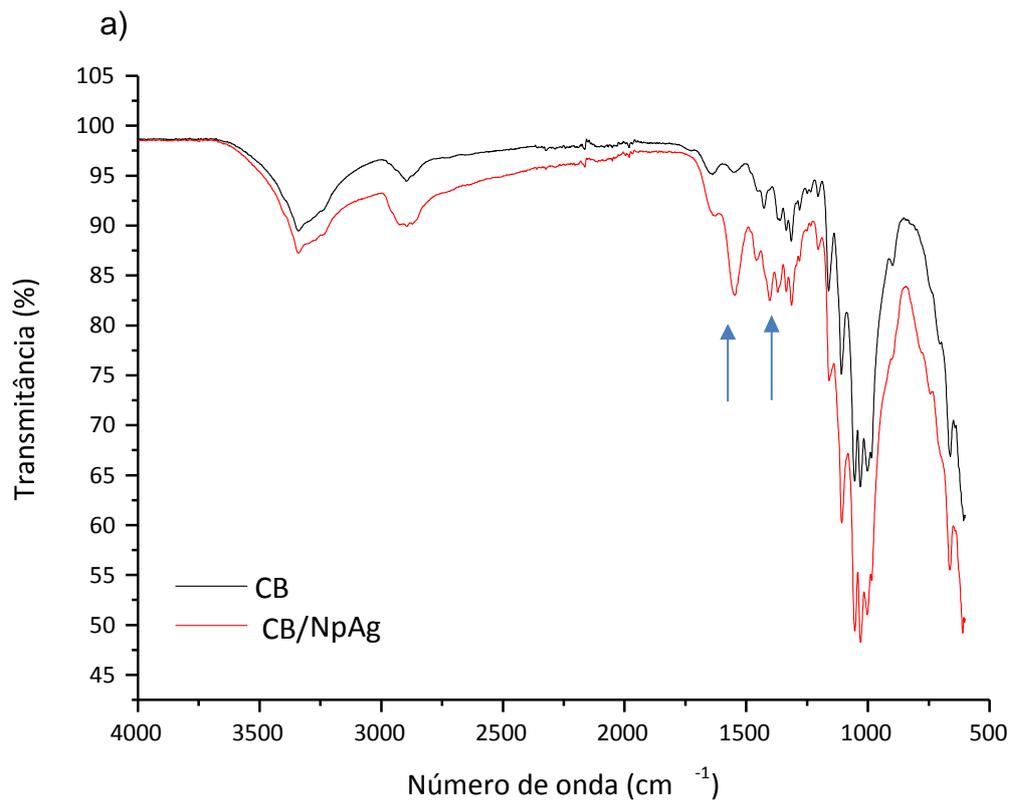
A análise por FTIR teve como objetivo identificar a presença na CB da substância usada na incorporação, pois a técnica evidencia ligações entre átomos que dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. Assim, examinando os espectros e comparando-os, foi possível verificar se houve a incorporação dos aromas e do antimicrobiano pelas membranas de CB.

Os espectros de FTIR das membranas de CB com incorporação de aromas e antimicrobianos e dos compostos puros estão apresentados nas Figuras 7 a 10.

Na figura 7 verifica-se que o espectro de FTIR da membrana de CB pura apresenta o perfil característico da CB reportada na literatura (DUARTE, 2014). A banda na região de 3.341 cm^{-1} , segundo Duarte (2014), é característica do estiramento dos grupos hidroxila presentes na membrana de CB. Além desta, as principais atribuições que caracterizam o polímero são: estiramento CH e estiramento assimétrico em 2.897 cm^{-1} ; deformação OH em 1.550 cm^{-1} ; deformação CH_2 em 1.424 cm^{-1} ; deformação OH em 1.315 cm^{-1} . Outra banda interessante, localizada ao redor de $400\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$, é característica da torção dos grupos OH.

Ainda na figura 7, observa-se que a membrana de CB/NpAg apresentou, além das bandas características da CB, uma banda na região de 1638 cm^{-1} , sinalizada com uma seta no espectro de FTIR da Figura 7a. Esta banda está presente também no espectro da NpAg, assim como a região de 1.350 cm^{-1} , indicando que possivelmente a solução de prata foi incorporada à membrana. A banda larga presente no espectro da NpAg que vai de $3.710\text{ a }2.840\text{ cm}^{-1}$ é devido a presença de água, pois a NpAg encontra-se em meio aquoso.

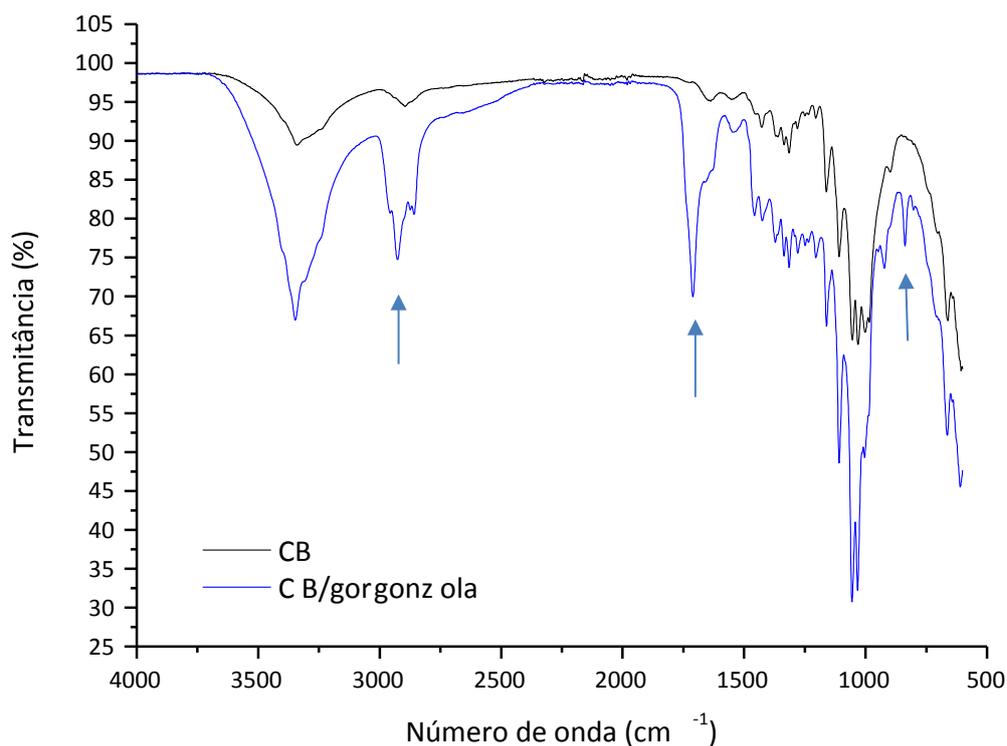
Figura 7 – Espectros de FTIR: a) membranas de CB e CB/NpAg; b) NpAg.

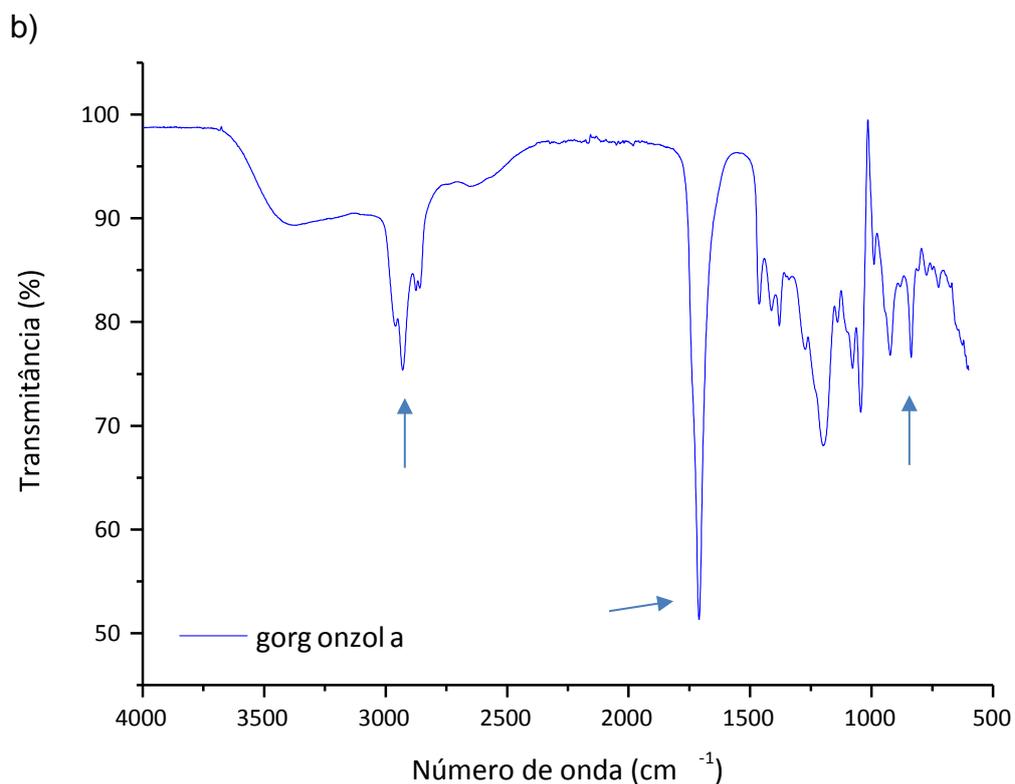


Para as membranas de CB/gorgonzola, outras bandas não características da CB foram encontradas e estão sinalizadas com uma seta no espectro de FTIR da Figura 8a. As bandas na região de 2934 cm^{-1} , 1709 cm^{-1} e 838 cm^{-1} são as mesmas bandas características do aroma de gorgonzola, como mostra a Figura 8b. A primeira indica presença de ligações de alcanos e alquenos, álcoois e fenóis em ligação intramolecular, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos. A segunda banda indica presença de ligações de alquenos, cetonas, aldeídos e a terceira de anéis aromáticos. Por fim, a terceira banda indica a presença de alquenos, aromáticos mononucleares e éteres (SILVERSTAIN, 2005). Percebe-se que as ligações características encontradas com o número de onda das três bandas tem relação com a composição do aroma, desta forma, é possível sugerir que este foi incorporado à membrana.

Figura 8 – Espectros de FTIR: a) membranas CB e CB/gorgonzola, b) gorgonzola.

a)

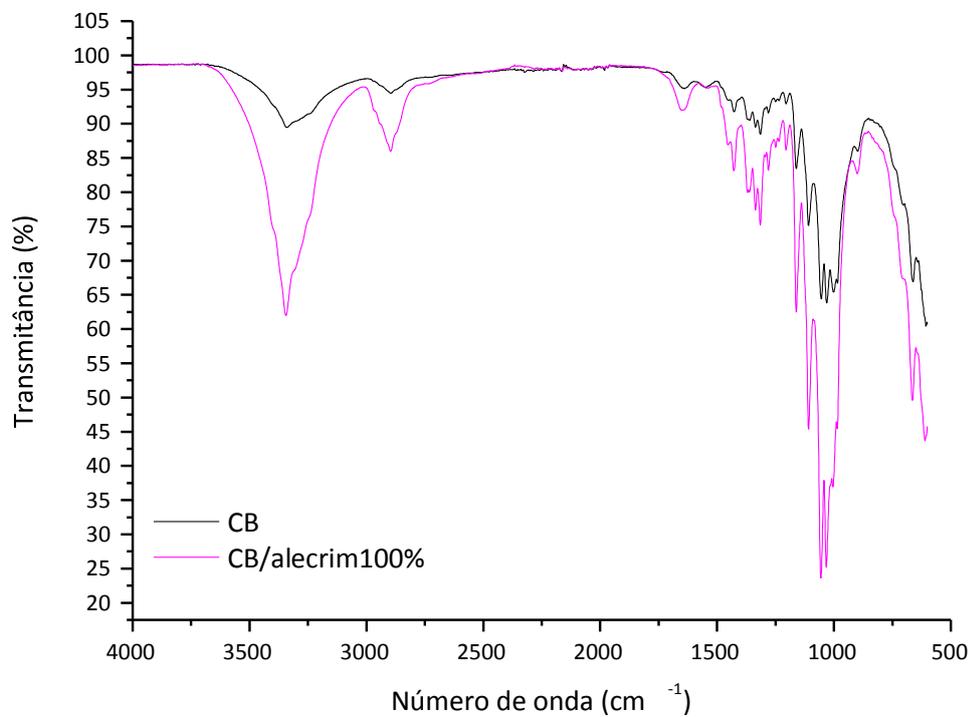




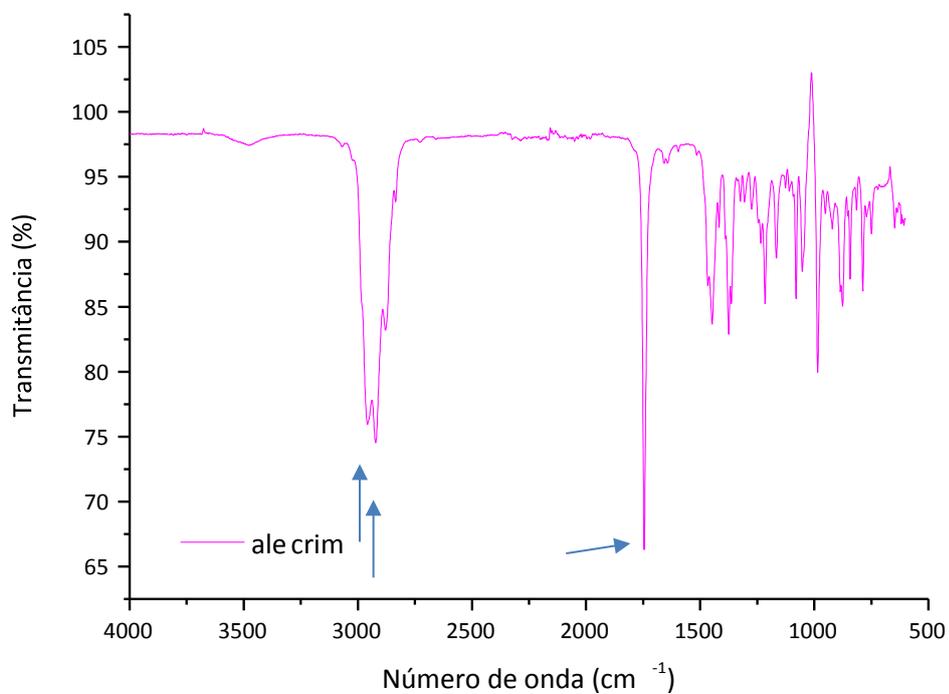
Já em relação às membranas de CB/alecrim100%, as bandas características do alecrim ($2958, 2926, 1748 \text{ cm}^{-1}$) e sinalizadas com uma seta no espectro da Figura 9b não foram encontradas no espectro da membrana de CB/alecrim (Figura 9a). Provavelmente, o alecrim não tenha sido incorporado à membranas, pois trata-se de um óleo e a membrana é hidrofílica, ou seja, sem afinidade. Outra possibilidade reside na análise ter sido feita sobre a superfície da CB ou por limitações do ATR, em decorrência da não homogeneidade na etapa de incorporação da membrana.

Figura 9 – Espectros de FTIR: a) membranas CB e CB/alecrim100%, b) alecrim100%.

a)



b)

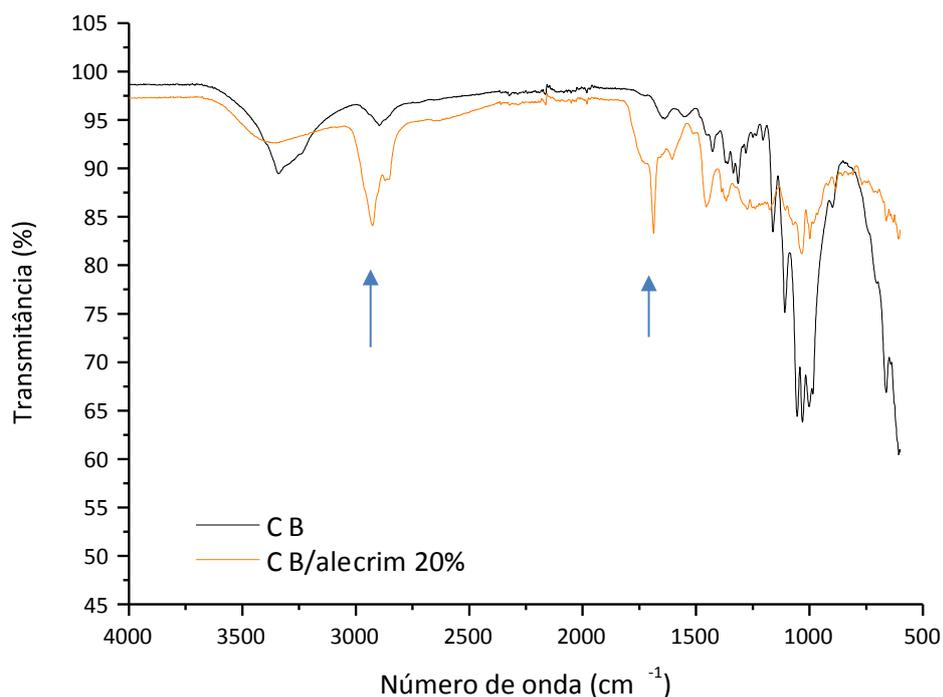


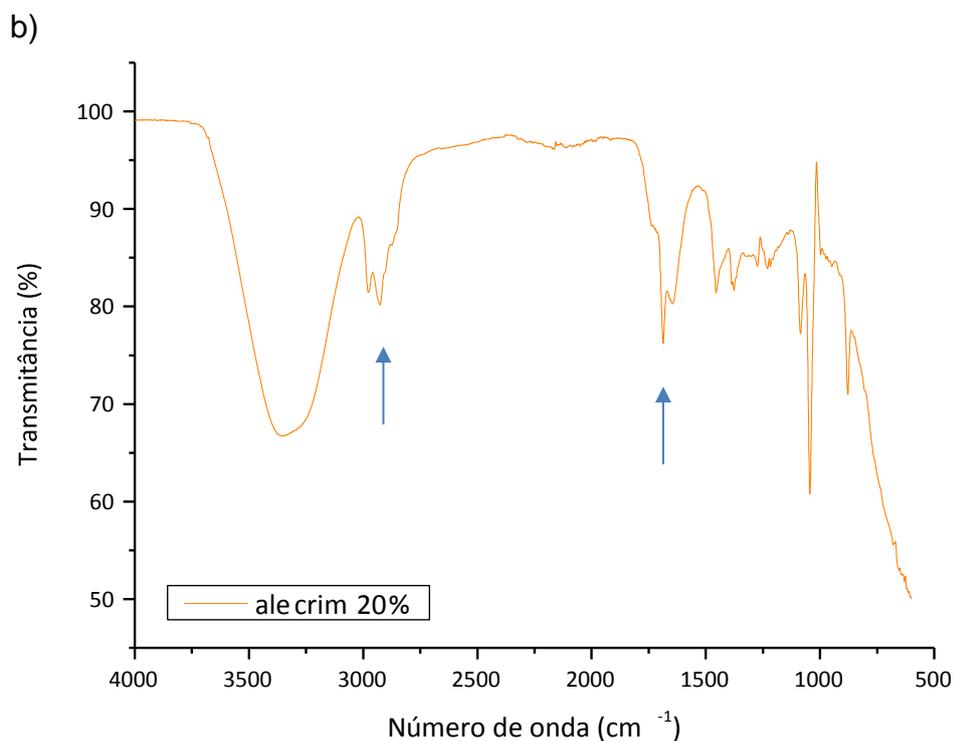
Em contrapartida, as membranas de CB/alecrim20% apresentaram comportamento diferente, como se observa na Figura 10a. Além das bandas

típicas da CB, foram encontrados os picos característicos do alecrim20%, em 2966 e 1685 cm^{-1} , sinalizados com uma seta (Figura 10b). O primeiro indica presença de ligações C-H alifáticas, alquenos, sugerindo a presença de ligações C=C, álcoois e fenóis, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos, característico a ácidos hidroxicinâmicos presentes na composição do alecrim. Já a segunda também indica a presença de alquenos, aromáticos, cetonas e aldeído (SILVERSTAIN, 2005). Percebe-se que as ligações características encontradas com o número de onda das duas bandas tem relação com os principais constituintes do alecrim, sendo que este contém em grande quantidade ácido rosmarínico, cafeico, clorogênico, linalol, geraniol, cineol, borneol, α -terpineol, esteroides do luteol, diosmetol e verbenona, segundo literatura. Dessa forma é possível sugerir que o alecrim20% foi incorporado à membrana.

Figura 10 - Espectros de FTIR: a) membranas CB e CB/alecrim20%, b) alecrim20%.

a)





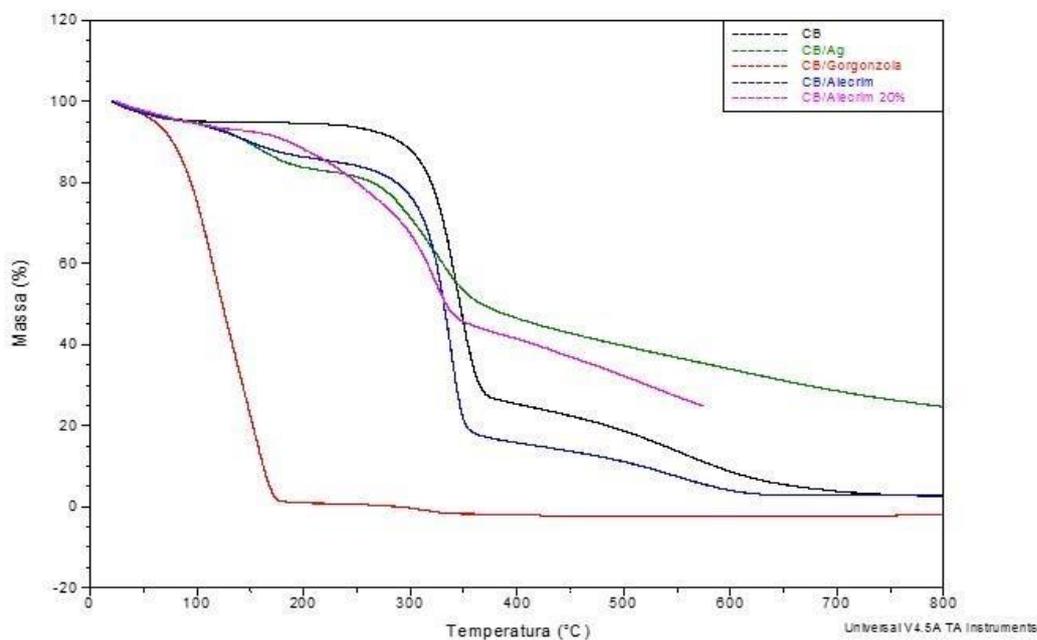
4.2.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica permitiu observar a perda de massa da amostra em função da temperatura. Esta técnica é utilizada para caracterizar a estabilidade térmica de polímeros frente a várias condições experimentais (BARUD, 2014).

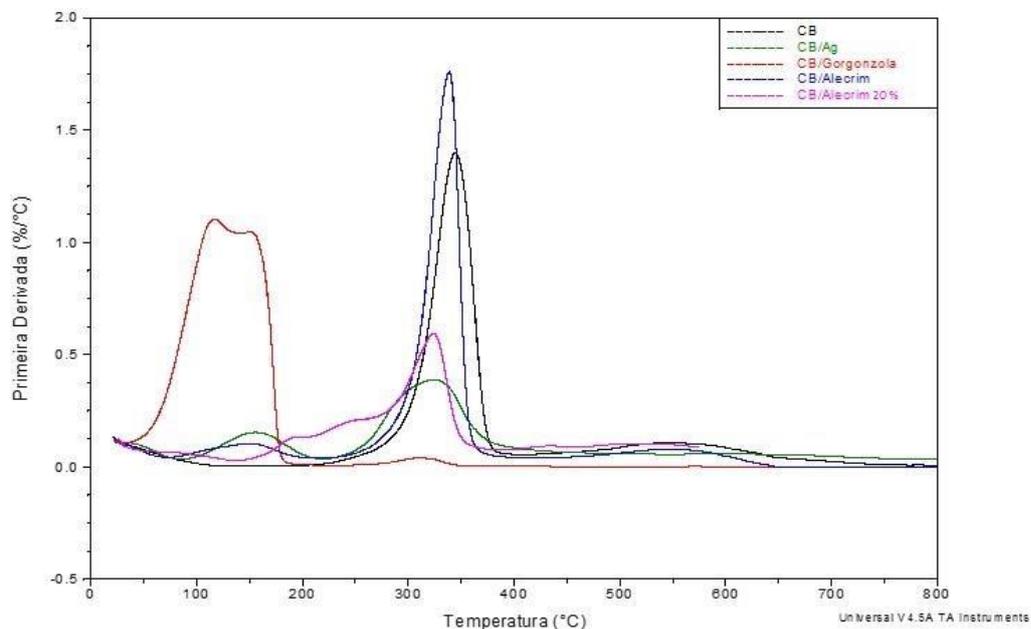
A Figura 11 mostra as curvas de TGA da CB pura e CB incorporada com aromas e antimicrobiano e a Tabela 1 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Figura 11 - Curvas obtidas por TGA para as amostras de CB incorporadas com aromas e antimicrobianos: a) curvas TG; b) curvas da 1ª derivada.

a)



b)



O perfil de degradação da CB mostra a ocorrência de 3 estágios de perda de massa, sendo que o primeiro estágio pode ser atribuído à perda de água, que ocorre no intervalo que, conforme Lima *et al.* (2015), compreende a temperatura ambiente ($\cong 30$ °C) até cerca de 150 °C, com 4,98 % de perda de massa. O segundo estágio causa acentuada perda de massa, estando associado à

degradação da celulose, que inclui a despolimerização, a decomposição das unidades de glicose e desidratação. A temperatura de início de degradação extrapolada (T_{onset3}) igual a 315,0 °C e a temperatura na qual a taxa de degradação é máxima (T_{max3}) igual a 344,3 °C, com perda de massa de 69,76 %, corrobora com valores citados na literatura (SILVEIRA, 2016). O terceiro e último estágio representa a degradação de resíduos carbonáceos, com T_{onset4} igual 487,1 °C, com perda de massa de 22,34 %, dados que também confirmam o que a literatura reporta (TEIXEIRA *et al.* 2010). O resíduo final observado foi de 2,73 %.

Para as membranas contendo NpAg (CB/Ag) observa-se a ocorrência de 4 estágios de perda de massa, sendo o primeiro estágio atribuído à perda de água com 4,76 % de perda de massa. Comparando-se com a CB pura, houve o aparecimento de um estágio de perda de massa, com T_{onset2} em 122,7 °C com 12,29 % de perda de massa, que sugere-se estar associado à água, pois as NpAg estavam dispersas em uma solução aquosa. O terceiro estágio observado foi em T_{onset3} igual a 276,8 °C com 45,37 % de perda de massa, referente à degradação da celulose. Observa-se então que a adição da solução de prata à membrana provocou uma diminuição da estabilidade térmica da CB de 38,2 °C. O resíduo final observado foi de 21,74 %, bem superior ao resíduo da CB pura.

As membranas de CB com gorgonzola (CB/gorgonzola) apresentaram um comportamento térmico distinto das outras membranas. Observou-se somente dois estágios de decomposição, sendo o primeiro estágio com T_{onset2} em 82 °C com a presença de dois picos de T_{max} e 99,26 % de perda de massa, atribuído ao gorgonzola e o segundo estágio com T_{onset3} igual a 290,8 °C com 2,66 %, referente à degradação da celulose. Assim, a adição de gorgonzola à membrana de CB provocou uma diminuição da estabilidade da CB de 24,2 °C. Não é possível explicar o elevado teor de gorgonzola e em consequência, o baixo teor de CB determinados nesta membrana.

As membranas de CB com alecrim100% (CB/alecrim100%) apresentaram 4 estágios de decomposição, sendo o primeiro de 4,30 % de água e o segundo com T_{onset2} em 109,7 °C e 9,94 %, estando talvez relacionado ao alecrim que não foi detectado por FTIR. O terceiro estágio apresentou T_{onset3} igual a 314,1 °C e 71,39 %, relacionado à degradação da celulose e o quarto estágio obteve T_{onset4} igual a 494,6 °C e 11,19 %, relacionado à degradação dos resíduos carbonáceos.

Dessa forma, no caso dos 9,94 % estarem relacionados ao alecrim, conclui-se que a incorporação à membrana não interferiu na estabilidade térmica da CB.

As membranas de CB com adição de alecrim 20 % (CB/alecrim 20%) apresentaram cinco estágios de perda de massa. O primeiro estágio ocorreu com 7,05 % de água (2,07 % superior que a umidade adsorvida na CB pura). O 2º estágio de decomposição ocorreu em T_{onset} igual a 171,8 °C e T_{max} igual a 188,9 °C contendo, 5,58 % de perda de massa que pode ser atribuído ao alecrim. O 3º estágio apresentou T_{onset} igual a 230,3 °C e $T_{\text{máx}}$ igual a 244,1 °C, contendo 9,91 % que também pode ser atribuído ao alecrim, visto que esse foi adicionado em uma mistura. O estágio referente à degradação da celulose apareceu em $T_{\text{onset}3}$ igual a 301,6 °C com 35,27 % e o último estágio que ocorreu em $T_{\text{onset}4}$ igual a 413,1 °C com 12,49 % de perda de massa, referente aos resíduos carbonáceos. Assim, a adição de alecrim 20 % às membranas de CB provocaram a diminuição da estabilidade térmica da CB em 13,4 °C.

Por meio dos resultados obtidos por TGA pode-se concluir que todas as membranas preparadas pelo procedimento *ex situ* incorporaram os aromas e NpAg em diferentes percentuais. Entretanto, a membrana de CB com alecrim100% se destacou, pois houve a incorporação do aroma sem alterar a estabilidade térmica da CB.

Tabela 1 - Dados obtidos por TGA para as amostras de CB incorporadas com aromas e antimicrobianos.

Amostras	Perda de massa 1 (%)	T _{onset2} (°C)	Perda de massa 2 (%)	T _{max2} (°C)	T _{onset3} (°C)	Perda de massa 3 (%)	T _{max3} (°C)	T _{onset 4} (°C)	Perda de massa 4 (%)	T _{max4} (°C)	Resíduo (%)
CB pura	4,98	----	----	---	315,0	69,76	344,3	487,1	22,34	557,3	2,73
CB/Ag	4,76	122,7	12,29	156,2	276,8	45,37	323,9	---	15,74	637,4	21,74
CB/ Gorgonzola	---	82,0	99,26	116,8 e 153,2	290,8	2,66	311,6	---	---	---	0
CB/Alecrim	4,30	109,7	9,94	148,5	314,1	71,39	338,7	494,6	11,19	548,8	3,17
CB/ Alecrim 20 %	7,05	171,8 e 230,3	5,58 e 9,91	188,9 e 244,1	301,6	35,27	324,2	413,1	12,49	481,9	24,89

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS MEMBRANAS

4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas puras

Para avaliar a eficácia antimicrobiana dos filmes incorporados com aromas e nanopartículas de prata, *E. coli* e *S. aureus* foram utilizados como microorganismos alvo, considerando sua relevante importância como patógeno na indústria de alimentos. Os resultados do teste de atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados do crescimento microbiano (*E. coli* e *S. aureus*) e % de redução do crescimento em contato com as membranas com diferentes aromas e nanopartículas de prata.

Membranas	<i>E. coli</i> (UFC/mL)	<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	redução <i>E. coli</i> (%)	redução <i>S. aureus</i> (%)
Controle (CB pura)	1,1x10 ⁷	1,52x10 ⁷	-	-
Alecrim 100%	x	x*	100	-
Gorgonzola	x	x	100	100
Alecrim 20%	1,39x10 ⁴	1,47x10 ⁴	99,87	99,9
Nanopartículas de prata	x	x	100	100

x: não houve crescimento

x*: não foi possível a contagem de células

Como pode ser observado, nas placas contendo as membranas incorporadas com NpAg, alecrim100% ou gorgonzola, não foi observado nenhum crescimento microbiano. Em parte, este resultado já era esperado, pois a literatura relata o alecrim e a prata como agentes antimicrobianos. Resultados similares de atividade antimicrobiana foram também registrados por Ribeiro *et al.* (2012), Jordán *et al.* (2013), Silva *et al.* (2009) e Müller (2013) para o alecrim e Esteves (2009), Sonai (2008) e Pelczar *et al.* (1996) relataram para prata. Este resultado para o alecrim demonstra que os 9,94 % no segundo estágio de degradação na curva de TGA eram do aroma, pois houve atividade antimicrobiana do mesmo, portanto foi incorporado à membrana. Sugere-se que tenha havido um problema

com o acessório do equipamento de FTIR para a não detecção do mesmo nas membranas através deste método.

Uma hipótese para o resultado satisfatório do não crescimento de bactérias nas membranas de gorgonzola, pode ser pela possível ação antimicrobiana do propilenoglicol, carreador desse aroma. Uma outra hipótese é a presença de outras substâncias antimicrobianas na formulação deste aroma as quais são desconhecidas.

Por outro lado, houve crescimento de *E. coli* e *S. aureus* na membrana de CB pura (controle) e na membrana contendo alecrim 20%, porém o percentual de redução para as membranas contendo alecrim 20 % foi de 99,87 % e 99,9 % para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Isto representa a redução de 3 ciclos logarítmicos para cada um dos micro-organismos. Este crescimento, ainda que bastante reduzido, pode ser justificado por esse aroma se tratar de uma mistura de água e álcool – 80 % e alecrim – 20 %, de forma que não eliminou todas as células.

4.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das membranas aplicadas nas embalagens de pães

4.3.2.1 Coliformes a 35 °C e *Salmonella*

Nas análises realizadas para coliformes a 35 °C e *Salmonella*, não observou-se indicadores de que havia presença desses micro-organismos, como formação de CO₂ ou mudança de cor do meio. Dessa forma, não foi necessário dar continuidade para ambos os testes e concluiu-se que todas as amostras resultaram em ausência para coliformes a 35 °C e *Salmonella*.

4.3.2.2 Fungos

A análise de fungos foi realizada apenas de forma visual, sendo anotado como tempo final o dia onde foi percebido o aparecimento de fungos filamentosos. O acompanhamento foi diário, com registro fotográfico. Realizou-se os testes com as membranas incorporadas com NpAg, Alecrim20% e gorgonzola (denominado em algumas fotos como queijo).

Os resultados mostraram-se bastante satisfatórios. Os pães embalados com membranas incorporadas com gorgonzola e o controle (pão embalado sem membrana) apresentaram bolor no 8º dia de acompanhamento (visualizados pelos círculos na figura 13 a e c), isto ocorreu três dias após o fim da validade estabelecida pelo fabricante. Já os pães embalados com membranas incorporadas com NpAg e Alecrim20% apresentaram bolor no 11º dia de acompanhamento (visualizados pelos círculos na figura 14 a e b). Isso sugere que, possivelmente, NpAg e Alecrim tiveram ação antimicrobiana sobre os pães a respeito de fungos, sendo que estes apareceram (forma visual) somente 6 dias após o fim da validade. Abaixo, figuras 12, 13, 14 mostram os dias 1, 8 e 11 de acompanhamento, respectivamente.

Figura 12: 1º dia de acompanhamento visual dos pães embalados afim de verificar aparecimento de fungos filamentosos. a) pão controle, b) pão embalado com membrana de NpAg, c) pão embalado com membrana de aroma de gorgonzola e d) pão embalado com membrana de aroma de alecrim.



Figura 13: 8º dia de acompanhamento visual dos pães embalados afim de verificar aparecimento de fungos filamentosos. a) pão controle, b) pão embalado com membrana de NpAg, c) pão embalado com membrana de aroma de gorgonzola e d) pão embalado com membrana de aroma de alecrim.

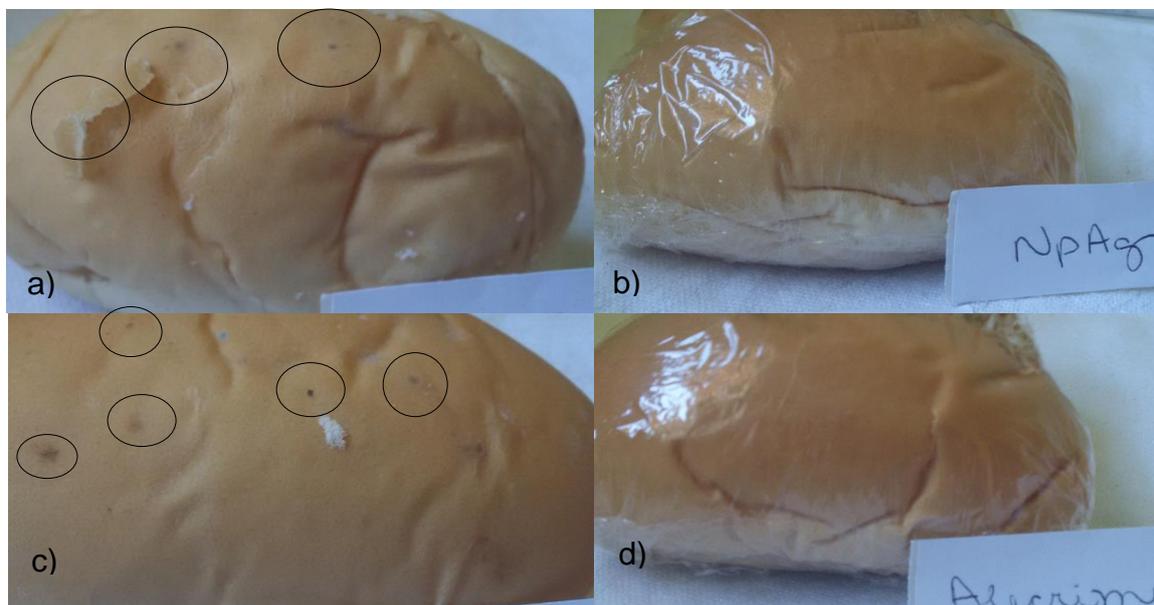
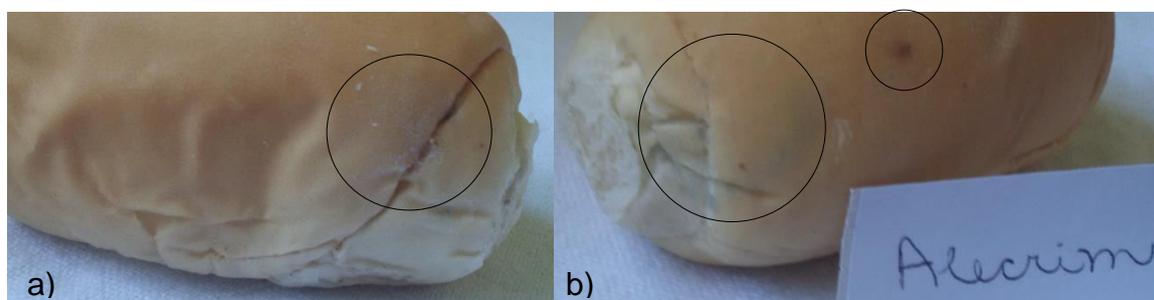


Figura 14: 11º dia de acompanhamento visual dos pães embalados afim de verificar aparecimento de fungos filamentosos. a) pão embalado com membrana de NpAg, b) pão embalado com membrana de aroma de alecrim.



4.4 ANÁLISE SENSORIAL

As amostras de pães embaladas com as membranas de alecrim20% e gorgonzola foram abertas em cinco dias, no meio da validade do pão. Foram escolhidos cinco voluntários através de pré seleção para realizar o teste. Dois deles eram do sexo feminino e três do sexo masculino. Todos entre 25 a 35 anos, com graduação. Quatro consomem até três fatias de pão por dia e um consome até quatro fatias de pão por dia. Os resultados se mostraram muito promissores,

pois todos os voluntários gostaram e comprariam ambos os sabores. Apenas algumas ressalvas foram apresentadas como “o sabor não se estendeu ao pão inteiro”, ou seja, não ficou bem distribuído, “este poderia ser mais intenso” e “a casca do pão estava seca”. Dois dos voluntários relataram também que “adoram queijos e por isso gostaram tanto do pão com o aroma de gorgonzola”. Descreveram também que “o pão com alecrim20% ficou refrescante”, usando o termo “fresh”. Relataram ainda que “gostaram dos sabores diferentes dos pães, melhorando um produto que é tão consumido no mundo inteiro”. Um dos avaliadores informou que “este tipo de produto, ao mesmo tempo que é bom, também induz o consumidor a comer mais”.

CONCLUSÃO

Houve a incorporação dos aromas de gorgonzola, de alecrim 20 % e das NpAg nas membranas de CB. No entanto, para a membrana adicionada de alecrim 100%, não foram observadas as bandas características no FTIR, porém a análise microbiana e a análise de TGA comprovam que foi incorporado aproximadamente 9,94 % deste aroma na membrana.

Por meio da análise microbiológica das membranas puras, conclui-se que o alecrim, o gorgonzola e as NpAg demonstraram ação antimicrobiana sobre as células de *E. coli* e *S. aureus*. As análises de coliformes a 35 °C e *Salmonella* nos pães embalados com as membranas resultaram em ausência destes microorganismos. Quanto a análise visual de crescimento de fungos filamentosos, percebeu-se que a adição do alecrim 20% e NpAg estenderam a vida útil do pão embalado até 11 dias sem aparecimento de bolor. Já o gorgonzola e o pão controle tiveram o mesmo desempenho, tendo bolores visíveis no 8º dia.

A análise sensorial dos pães teve resultado satisfatório, sendo que todos os avaliadores gostaram dos pães com aromas de alecrim e gorgonzola e comentaram que comprariam esse tipo de produto caso disponível no mercado.

Assim, a incorporação de aromas de alecrim, de gorgonzola e NpAg em membranas de CB, mostraram-se promissoras para aplicações em embalagens alimentícias, considerando que a CB é biodegradável e sua síntese pode ser realizada a partir de resíduos agroindustriais como alternativa de cultivo. Além disso, a propriedade antimicrobiana incorporada na CB propicia um aumento do tempo de vida dos alimentos, bem como gera vantagens à saúde, pois menos conservantes são utilizados nos alimentos, características desejáveis em alimentos mais saudáveis.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D.M.; WOICIECHOWSKI, A.L.; WOSIACKI, G. Propriedades Físicas, Químicas e de Barreira em filme Formados por Blenda de Celulose Bacteriana e Fécula de Batata. **Polímeros**. v. 23, n. 04, p. 538 - 546, 2013.

Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials (ASTM E2180). Disponível em < <https://www.astm.org/Standards/E2180.htm>. Acesso em 20/04/2017.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative food science e emerging technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.

BARUD, H. **Caracterização e avaliação da citocompatibilidade de nanocompósitos baseados em celulose bacteriana e fibroína para aplicação em regeneração tecidual**. Dissertação mestrado. Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Araraquara, 2014.

BATTISTI, R. **Desenvolvimento de folha celulósica com revestimento biodegradável e ações antimicrobiana e antioxidante para uso como embalagem ativa em carne bovina fresca**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BRAGA, L.R.; PERES, L. Novas Tendências em Embalagens para Alimentos: revisão. **Boletim do Centro de Processamento de Pesquisa de Alimentos - Ceppa**. v.28, n. 01, p. 69 - 84, 2010.

BOLDRIN, L.F. **Biossíntese, Aplicabilidade e recentes avanços no estudo da celulose bacteriana**. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Bioquímica Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

CAMILLOTO G.P.; SOARES N.F.F.; PAULA F.S.; PIRES A.C.S. **Desenvolvimento de filme plástico incorporado com triclosan para conservação de presunto fatiado**. 24^o Congresso Nacional de Microbiologia, Brasília. Anais. CD-ROM, 2007.

CHAUDHRY, Q.; WATKINS, R.; CASTLE, L. Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns. **RSC Nanoscience & Nanotechnology**. v. 14, n. 14, p. 1-17, 2010.

CHAWLA, P.R.; BAJAJ, I.B.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**. v. 47, n. 02, p. 107-124, 2009.

CUTTER, C.N. Microbial Control By Packaging: a review. **Food Science and Nutrition**. v. 42, n. 02, p. 151 - 161, 2002.

DONINI, I.A.N.; SALVI, D.T.B.; FUKUMOTO, F.K.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H.S.; MARCHETTO, R.; MESSADEQ, Y.; RIBEIRO, S. Biossíntese e Recentes Avanços na Produção de Celulose Bacteriana. **Eclética Química**. v.35, n. 04, p. 165 - 178, 2010.

DUARTE, E.B. **Produção de nanocompósitos de celulose bacteriana e hidroxiapatita como rota para valorização de resíduos agroindustriais**. Tese doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

ESPITIA P.J.P.; SOARES N.F.F.; SALGADO J.J.; HOYOS J.A.; MELOM N.R.; PEREIRA J.M.K. **Avaliação de filme ativo aromatizado no acondicionamento de chocolate branco**. 21º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. Anais. CD-ROM, 2008.

ESTEVES, D. **Aperfeiçoamento das técnicas de avaliação da actividade antimicrobiana em produtos têxteis**. Dissertação de mestrado em Bioquímica. Universidade da Beira Interior, Portugal, 2009.

FERREIRA, M. P. F. **Embalagens ativas para alimentos: Caracterização e Propriedades**. Tese de Doutorado em Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2012.

GONTARD, N. **Active Packaging**. Workshop sobre Biopolímeros. FZEA, 1997.

GREINER, R. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. **Nutrire: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. v. 34, n. 1, p. 243-260, 2009.

HAMMER, K. A.; C. F. CARSON.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, p. 985 – 990, 1999.

HUBER, M.; RUIZ, J.; CHASTELLAIN, F.; Off-flavour Release From Packagind Materials and its Prevention: a foods company's approach. **Food Additives and Contaminats**. v.19, p. 370 - 378, 2002.

JORDÁN, M.J.; LAX, V.; ROTA, M.C.; LORÁN, S.; SOTOMAYOR, J.A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. **Food Control**., v. 30, p. 463 - 468, 2013.

KOTLER, P.; KELLER, K.L. **Administração de Marketing**. 12 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

KROCHTA, J.M. **Food Packaging**. Handbook of Food Engineering. 2ª ed, cap 13: Active and Intelligent Packaging: applications and regulatory aspects, 2007.

LAGARON, J.M. Entrevista disponível em: <<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd440/noticias6.html>. Acesso em 10/10/2016.

LEI, S. G.; HOA, S. V.; TON-THAT, M. T. Effect of clay types on the processing properties of polypropylene nanocomposites. **Composites Science and Technology**. v. 66, p. 1274-1279, 2006.

LIMA, L.R.; SILVA, G.B. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Química Nova**. v. 38, n. 9, p. 1140-1147, 2015.

LIMEIRA, T.M.V. **Administração de Produtos**. Gestão de Marketing. Ed. Saraiva. São Paulo, 2006.

MARKARIAN, J. Consumer Demand Push Growth in Additives for Active Packaging. **Plastics, Additives and Compounding**. v. 08, p.30 - 33, 2006.

MARCHIORE, N.G. **Avaliação da Difusão de Prata em Salsichas Recobertas com Filmes Comestíveis Contendo Nanopartículas Antimicrobianas**. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia de Alimentos. Campo Mourão, 2015.

MARTINS, P.R.; DULLEY, R.D.; RAMOS, S.F.; NOGUEIRA, E. A.; BARBOSA, M.Z.; ASSUMPÇÃO, R.; JUNIOR, S. N.; LACERDA, A.L.S. **Nanotecnologias na Indústria de Alimentos**. VI Ciclo de Debates em Economia Industrial, Trabalho e Tecnologia – EITT - PUC. p. 1-15, São Paulo, 2008.

MEDEIROS H.S.; HÚNGARO H.M.; SOARES N.F.F.; GUTTIERRES A.P.M.; CRESPO J.M.R.S.; CRESPO M.S.; PEREIRA J.M.A.T.K.; MELO N.R. **Avaliação sensorial de manteiga aromatizada por embalagens ativas**. 21º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. Anais. CD-ROM, 2008.

MICHELS, C. **Efeito Inibitório de Nanopartículas de Prata na Atividade de Bactérias Oxidadoras de Amônia**. Teste de Doutorado em Engenharia Química. Florianópolis, 2016.

MOHITE, B. V.; PATEL, S. V. A novel biomaterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 61, p. 101 -110, 2014.

MÜLLER, L. **Incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana e avaliação da atividade antimicrobiana e cicatrizante**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PELCZAR JÚNIOR, M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia, Conceitos e Aplicações**. Pearson. v.1, 2.ed, 1996.

PEREIRA J.M.T.A.K.; SOARES N.F.F.; BAFFA J.J.C.; MELO N.R.; MINIM V.P.R.; MATTOS J.C.S. **Desenvolvimento e avaliação de pazinha ativa aromatizada, com café torrado e moído, para uso com sorvete**. 21º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. Anais. CD-ROM, 2008a.

PEREIRA, J.M.T.A.K.; SOARES, N.F.F.; OLIVEIRA, A.N.; MARTINS, M.C.P.; OLIVEIRA, C.G.; MATTOS, J.C.S.; LOPEZ, M.L.S.; ESPITIA, P.J.P.; MELO N.R.

Aromatização de presunto por embalagem ativa. 21º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. Anais. CD-ROM, 2008b.

PEREZ, F.S.; BERTAGNOLLI, S.M.M.; ALVES, M.P.; PENNA, N.G. Nanotechnology: applications for the food sector. **Disciplinarum Scientia**. v. 13, n. 1, p. 97-110, 2012.

PIRES, A.C.S. **Desenvolvimento e avaliação de filmes e sachê antimicrobianos na conservação de queijo mussarela fatiado.** Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

PIRES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SOARES, N.F.F.; VIDIGAL, M.C.T.R. **Desenvolvimento e avaliação de sachê aromático para leite fluido.** 21º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. Anais. CD-ROM, 2008a.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; ANDRADE, N.J.; SILVA, L.H.M.; CAMILLOTO, G.P.; BERNARDES, P.C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology and Science**, v. 21, p. 375-383, 2008b.

QUINA, Frank H. Nanotecnologia e o Meio Ambiente: Perspectivas e Riscos. **Química Nova**. v. 27, N. 6, p. 1028-1029, 2004.

REBELLO, F.F.P. Revisão – Novas Tecnologias Aplicadas às Embalagens de Alimentos. **Revista Agrogeoambiental**. v. 01, n. 03, p. 156 - 164, 2009

RECOUVEREX, D.O.S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

RIBEIRO, D. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos in vitro e em matriz alimentícia.** Dissertação mestrado em Ciência de Alimentos. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RIBEIRO, D.; MELO, D.B. **Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) como modulador da resistência bacteriana.** Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v.33, n. 2, p. 687-696, 2012.

ROONEY, M. **Reactive Packaging Materials for Food Preservation.** Proceedings of the First Japan-Australia Work Shop of Food Processing, 1992.

SANTIAGO-SILVA, A.; SOARES, N.F.S.; NOBREGA, J.E.; JUNIOR, M.A.W.; BARBOSA, K.B.F.; VOLP, A.C.P.; ZERDAS, E.R.M.A.; WURLITZER, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_ 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**. v. 20, p. 85 - 89, 2009.

SANTOS, V. M.; ALVES, W. C. **Desenvolvimento de compósitos a base de nanocelulose impregnada em nanopartícula de prata visando sua aplicação**

- em biossensores eletroquímicos.** Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal Fluminense, 2017.
- SILVA, C.A.S; SOARES, N.F.S; ABREU, E.S; LAUREANO, J; ALMEIDA, A.S; MELO, N.R; PEREIRA, J.M.A.T.K. **Desenvolvimento de embalagem ativa aromatizada para utilização em salsicha.** 21º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte. Anais. CD-ROM. 2008a.
- SILVA, W.A. **Desenvolvimento e avaliação de embalagens ativas para a melhoria da segurança alimentar de amendoim (*Arachis hypogaea* L.).** Tese de doutorado Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008b.
- SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 3, p. 257-262, 2009.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, NELIANE.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** ed. Varela, 4ª edição, 2010.
- SILVEIRA, J.F.C. **Nanocristais de celulose bacteriana: da obtenção, sob diferentes condições de hidrólise, à incorporação como reforço em poli(L-ácido láctico).** Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2016.
- SILVERSTAIN, M.R.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos.** Editora LTC, 7ª edição, 2005.
- SOARES, N.F.F.; ESPITIA, P.J.P.; PACHECO, J.J.R.; BOLAÑOS D.G.; TEHERAN J.E.D.; VILLADIEGO, A.M.D. **Desenvolvimento e avaliação de filmes de base celulósica incorporados com nano-compostos e antimicrobianos na carne bovina fresca.** 24º Congresso Nacional de Microbiologia, Brasília. Anais. CD-ROM, 2007.
- SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; PERES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SILVA, P.S.; **Novos Desenvolvimentos e Aplicações em Embalagens de Alimentos.** **Ceres.** Jul – ago, 2009.
- SOUSA, L. C. F. S.; Sousa, J. S.; BORGES, M. G. B.; MACHADO, A. V.; SILVA, M.J.S.; FERREIRA, R.T.F.V.; SALGADO, A.B. **Tecnologia de Embalagens e Conservação de Alimentos Quanto aos Aspectos Físico, Químico e Microbiológico.** Agropecuária Científica do Semiárido – ACSA. v. 8, n. 08, p. 19-27, 2012.
- SONAI, G.V. **Preparação e caracterização de nanopartículas de Prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone contendo trans-[RuCl₂(vpy)₄] para fins antimicrobianos.** Relatório graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**. v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

SUVEGES, N.S. **Estudo da adição de produtos vegetais no biodiesel de canola e de girassol visando à estabilidade térmica e oxidativa**. Dissertação mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, 2014.

TEIXEIRA, E.M.; GARCIA, G. Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros**. v. 20, n. 4, p. 264-268, 2010.

VERMEIREN, L.; DEVIEGLERE, F.; DEVEBERE, J. Effectiveness of Some Recent Antimicrobial Packaging Concepts. **Foods Additives and Contaminants**. v. 19, p. 163 - 171, 2002.

YAM, K.L.; TAKHISTOV, P.T.; MILTZ, J. Intelligent Packaging: Concepts And Applications. **Journal of Food Science**. v. 70, n. 01, p. 1 - 10, 2005.

ZANOTI, M.D.UH. **Membranas de Celulose Bacteriana com anti-inflamatório ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas**. Tese de doutorado em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

Anexo I: Modelo teste de aceitação preenchido pelos voluntários

Dados pessoais

Nome:

telefone para contato/e-mail:

Faixa etária

- menos que 25
- de 25 a 35 anos
- de 36 a 50 anos
- mais que 50 anos

Sexo

- feminino
- masculino

Formação

- 1º grau
- 2º grau
- graduado
- Pós-graduado

Frequência de consumo

- Consumo muito (mais que 4 fatias por dia)
- Consumo moderadamente (até 3 fatias por dia)
- Consumo ocasionalmente (5 fatias por semana)
- Consumo muito pouco (2 fatias por semana)
- Não consumo este tipo de produto

Por favor, agora prove a amostra codificada de pão e avalie o quanto você gostou ou desgostou da mesma utilizando a escala abaixo:

- gostei muitíssimo
- gostei muito
- gostei moderadamente
- gostei ligeiramente
- não gostei/nem desgostei
- desgostei ligeiramente
- desgostei moderadamente
- desgostei muito
- desgostei muitíssimo

Cite o que você mais gostou na amostra:

Cite o que você menos gostou na amostra:

Você compraria este produto?

AUTORIZAÇÃO

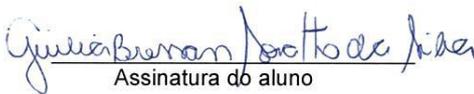
Nome do autor: Giulia Bressan Soratto da Silva

RG: 5 724 622 - SSP/SC

Título da Dissertação: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA VISANDO APLICAÇÃO EM EMBALAGENS ATIVAS

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 01 de fevereiro de 2018.


Assinatura do aluno