

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

**ADITIVOS NATURAIS ENCAPSULADOS EM SÍLICAS
HÍBRIDAS: APLICAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DE
ALIMENTOS**

Alexandra Duprates Steiner

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos
Orientador

Porto Alegre

2015

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

**ADITIVOS NATURAIS ENCAPSULADOS EM SÍLICAS
HÍBRIDAS: APLICAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DE
ALIMENTOS**

Alexandra Duprates Steiner

Dissertação – Mestrado em Química do
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRGS.

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos
Orientador

**Porto Alegre
2015**

À minha família: meu amado esposo Fernando e meu amado filho Otávio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e saúde para completar mais essa etapa na caminhada do conhecimento.

Agradeço ao meu marido e amor Fernando pela paciência e apoio nos momentos de ausência, desânimo e descontrole emocional.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFRGS que contribuíram para meu enriquecimento curricular e em especial ao professor Dr. João Henrique, por sua disposição, apoio, paciência e principalmente sabedoria na transmissão de seus ensinamentos durante a orientação desta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Federal de Concórdia – SC e ao professor Dr. Nei e seus colaboradores pelo apoio na realização de análises específicas e contribuições significativas para desenvolvimento deste estudo.

Agradeço aos colegas de curso e principalmente aos colegas do Laboratório K106 pelas trocas de experiências, auxílio, conhecimentos e pelas amizades que conquistei. Não poderia deixar de destacar o colega de curso Luiz pelo apoio e auxílio durante as aulas de Fisicoquímica Avançada e aos que considero muito mais que colegas de laboratório, pessoas que marcaram a minha trajetória de vida, não só pelas suas contribuições significativas de conhecimento para concretização desse estudo, mas pela convivência com seres humanos únicos, portanto muito especiais. Essas pessoas especiais são Cristiane, Yolice, Artur, Eliana, William Leonardo, Cícero, Luiz Fernando e Marcéo.

Agradeço a Chr Hansen Ind. e Com. Ltda e TANAC SA pela gentileza de fornecer amostras de extrato contendo antocianinas e tanino, respetivamente.

Agradeço também ao Instituto SENAI de Inovação em Engenharia de Polímeros pela disponibilidade para realização dos ensaios mecânicos.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído.

RESUMO

Visando atender às necessidades de consumidores mais exigentes e preocupados com a saúde, este trabalho propôs um estudo de propriedade antimicrobiana de extratos naturais como antocianinas, tanino, urucum, curcumina e extrato de folha de oliveira e antioxidante para antocianinas, todos em sua forma livre e encapsulados numa rede de sílica. Diante das características de mudança de coloração do extrato de antocianinas frente à alteração de pH do meio o uso desse composto no desenvolvimento de filme em matriz polimérica de quitosana/PVA como embalagem ou etiqueta ativa e inteligente.

Os extratos foram encapsulados em sílica em diferentes concentrações variando de 2,5% a 50% utilizando rota ácida e rota básica com precursor tetraetoxisilano e caracterizados quanto à preservação da funcionalidade e estrutura molecular, textura e morfologia e estabilidade térmica.

Os filmes foram avaliados quanto às propriedades mecânicas, espessura, análises térmicas, caracterização química e análise de mudança de cor com filé de peixe tilápia (*Tilápia rendali*) cru com aplicação direta sobre a carne, sob refrigeração, correlacionada com mudança de pH do peixe e Contagem Bacteriana Total (CBT).

Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que dentre os bioativos livres o urucum, tanino e antocianina apresentaram resultados bastante satisfatórios quanto à ação antimicrobiana com zona de inibição no método de difusão entre 10 a 22 mm. Quando encapsulados, os extratos destaque foram a antocianina e o tanino com zona de inibição entre 9 a 21mm. Quanto ao filme indicador avaliado demonstrou ser um bom indicador de pH ao mudar de cor via colorímetro mas a olho nu a mudança não foi percebida nitidamente. A sua resistência à ruptura aumentou em aproximadamente 20 vezes em relação ao filme controle. Entretanto a deformação na ruptura diminuiu em torno de 30% tornando-o mais rígido.

Palavras-chave: extratos naturais; método sol-gel; embalagem ativa e inteligente

ABSTRACT

The present work investigated needs of demanding and concerned consumers with their health, this work proposes a study of antimicrobial and/or antioxidant properties of natural extracts as anthocyanins, tannin, anatto, curcumin and olive leaf extracts and antioxidant for anthocyanins, in free state and encapsulated within silica network. Due to of color change features of anthocyanins extract under pH variation, this compound was used in the preparations of chitosan/PVA film as intelligent and active packaging.

The extracts were encapsulated in silica in different concentrations from 2,5% to 50% using acid and basic sol-gel catalyzed route route with tetraetoxisilane as precursor and characterized as the functionality preservation and molecular structure, texture and morfology and thermal stability.

The films were evaluated in terms of mechanical properties, thickness, thermal analysis, chemical characterization and fish fillet tilápia (*Tilápia rendali*) crude color change analysis with direct application on meat, under refrigeration, correlated with fish pH changing and Total Bacterial Counting (CBT).

The results were promising since among the free bioactive the anatto, tannin and anthocyanin showed very satisfactory results in terms of antimicrobial action with inhibition zone in the diffusion method between 10 to 22 mm. When encapsulated, the featured extracts were anthocyanin and tannin with inhibition between 9 to 21mm. The measured indicator film demonstrated to be a good pH indicator because color changing through colorimeter but to the naked eye the color changing was not clearly observed. The rupture strength increased about 20 times comparing to the control film. However the elongation at break decreases around 30% turning it hard.

Keywords: natural extract; sol-gel method; active and inteligent packaging

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ESQUEMAS	XIII
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 EMBALAGENS INTELIGENTES	18
2.1.1 INDICADOR DE FRESCOR E PH	22
2.2 ESTADO-DA-ARTE	29
2.3 EXTRATOS NATURAIS – ALTERNATIVA COMO ADITIVOS PARA ALIMENTOS	32
2.3.1 CÚRCUMA OU CURCUMINA	34
2.3.2 URUCUM (BIXINA E NORBIXINA)	35
2.3.3 EXTRATO DE OLIVA	36
2.3.4 ANTOCIANINA	38
2.3.5 TANINO	42
2.4 PROCESSO SOL-GEL DE SÍNTESE	45
3. OBJETIVOS	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 MATERIAIS	51
4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	51
4.2.1 ENCAPSULAMENTO DO COMPOSTO BIOATIVO VIA MÉTODO SOL-GEL	51
4.2.2 PREPARAÇÃO DO FILME ATIVO E INDICADOR	54
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS E DO FILME ATIVO E INDICADOR	55
4.3.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	55
4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL (UV-VIS)	56
4.3.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL POR REFLETÂNCIA DIFUSA (DRS)	56

4.3.3.1 Análise semi-quantitativa do teor de antocianinas nas amostras de material encapsulado em sílica	56
4.3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSA POR INSERÇÃO DIRETA	57
4.3.5 MÉTODO DE BET DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO DE NITROGÊNIO	58
4.3.6 ESPALHAMENTO DE RAIO X DE BAIXO ÂNGULO (SAXS)	58
4.3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)	59
4.3.8 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLM)	59
4.3.9 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	59
4.3.10 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	60
4.4 AVALIAÇÃO DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS	60
4.4.1 ENSAIO DE LIXIVIAÇÃO	61
4.4.2 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS	62
4.4.2.1 Preparação dos inóculos	62
4.4.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana	62
4.4.3 CONTAGEM MICROBIANA DE PESCADO EMBALADA	64
4.4.4 PH	64
4.4.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	64
4.5 AVALIAÇÃO DO FILME ATIVO E INDICADOR	65
4.5.1 ANÁLISE DE COR (COLORIMÉTRICA)	65
4.5.2 MEDIDA DE ESPESSURA E PROPRIEDADES MECÂNICAS	66
4.5.2.1 Medida de espessura	66
4.5.2.2 Resistência à tração	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
<hr/>	
5.1.1 EXTRATO DE OLIVA	74
5.1.2 ANTOCIANINA	75
5.1.3 TANINO	86
5.1.4 URUCUM	88
5.2 CARACTERIZAÇÃO TEXTURAL E MORFOLÓGICA DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS	89
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO TEXTURAL POROSIMÉTRICA	90
5.2.2 CARACTERIZAÇÃO TEXTURAL E MORFOLÓGICA	91
5.3 AVALIAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	99
5.4 AVALIAÇÃO DE SINERGISMO TANINO X ANTOCIANINA	100
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	103
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO FILME ATIVO E INDICADOR	105
5.6.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL POR REFLETÂNCIA DIFUSA (DRS)	105
5.6.2 ANÁLISES TÉRMICAS – TERMOGRAVIMETRIA (TGA) E CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC)	106
5.6.3 ESPESSURA DOS FILMES E TESTE DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO	109
5.6.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DINÂMICOS DO FILME INDICADOR – VARIAÇÃO TOTAL DE COLORAÇÃO	111
4 CONCLUSÃO	116
<hr/>	
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
<hr/>	

ABREVIATURAS

DTA – Doenças transmitidas por alimentos
MAP – Modified Atmosphere Pack (Embalagem sob atmosfera modificada)
CMC – carboximetilcelulose
SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária
MS – Ministério da Saúde
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
GMC – Grupo Mercado Comum
FDA – Food and Drug Administration
ESFA – European Food Safety Authority
IDA – Ingestão diária aceitável
ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária
FAO – Food and Agriculture Organization
CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DHPEA – dihidroxifeniletanol
TEOS – tetraetiletoxissilano
TMOS – tetrametilmtoxissilano
PCZ – Ponto de carga zero
PVA – álcool polivinílico
HCl – ácido clorídrico
NaOH – hidróxido de sódio
PEBD – polietileno de baixa densidade
FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
SAXS – Espalhamento de raio X a baixo ângulo
UV-vis – ultravioleta e visível
DRS – Espectroscopia por Refletância Difusa
GC – MS – Espectrometria de massa – Cromatografia gasosa
LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura
CLM – Microscopia Confocal de Varredura a Laser
DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

TGA – Análise Termogravimétrica

UFC – Unidade formadora de colônia

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

CBT – Contagem Bacteriana Total

PCA – Plate Count Agar

ABTS – ácido 3-etilbenzotiazolinona-6-sulfônico

ASTM – American Society for Testing Materials

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de calibração para encapsulados com antocianina	57
Figura 2. Curva de calibração para antocianina em solução aquosa	61
Figura 3. Foto ensaio de resistência à tração (corpo de prova do filme controle). ...	67
Figura 4. Ensaio de difusão em disco com <i>Staphylococcus aureus</i> para tanino (1), urucum, (2) gentamicina (3) e com <i>Bacillus cereus</i> para tanino (4).....	69
Figura 5. GC-MS do extrato de oliva puro.	74
Figura 6. Espectro UV-Vis por DRS da antocianina e seus respectivos materiais encapsulados obtidos via rota ácida (ANT25A) e rota básica (ANT25B).	77
Figura 7. Espectro UV-vis do lixiviado da amostra ANT20A4h.....	78
Figura 8. Concentração de antocianina lixiviada em meio aquoso em função do tempo. Resultado referente a uma única determinação.	78
Figura 9. Fotos de antocianina pura (1), antocianina encapsulada via rota ácida (2) e antocianina encapsulada via rota básica (3).....	79
Figura 10. Espectro infravermelho das amostras de antocianina e respectivos encapsulados (ANT50B e ANT37A).....	81
Figura 11. Micrografia da antocianina no intervalo de comprimento de onda em que a intensidade do extrato de antocianina é máxima.....	84
Figura 12. Micrografia dos encapsulados com antocianina ANT50B (1), ANT25A (2), ANT20A4H (3) e ANT11A (4).	85
Figura 13. Espectro infravermelho das amostras de tanino livre e tanino encapsulado (TAN25B).....	86
Figura 14. Espectro de infravermelho de extrato de urucum e material encapsulado (URU25A).....	88
Figura 15. Curva de SAXS da amostra de extrato de oliva encapsulado (OLI2.5A). 92	
Figura 16. Curvas de SAXS dos materiais com antocianina encapsulada.	94
Figura 17. Curva de SAXS encapsulados de tanino (TAN25B).....	96
Figura 18. MEV do encapsulado, ANT50B (1), ANT37A (2) e ANT20A2h (3)	97
Figura 19. MEV do encapsulado TAN25A (1) e TAN25B (2).....	98
Figura 20. Espectro de infravermelho de ATA e ATB.....	102

Figura 21. Espectro no UV-Vis (DRS) da antocianina, filme controle e do filme indicador.....	106
Figura 22. Curvas TGA do filme indicador (A) e do filme controle (B).....	107
Figura 23. Curvas DSC do filme controle (A) e do filme indicador (B).....	108
Figura 24. Gráfico degradação filé de peixe Tilápia sob refrigeração em 10 dias. .	111
Figura 25. Fotos do filme controle (1) e do filme indicador (2).....	112
Figura 26. Filé de peixe tilápia com filme indicador aplicado na superfície (após 4 dias de exposição).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Exemplos de indicadores internos e externos e seus princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes. Adaptado de ⁸	20
Tabela II. Exemplos de indicadores internos e externos e seus princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes comercialmente disponíveis. Adaptado de ²³	21
Tabela III. Exemplos de produtos naturais empregados como aditivos em alimentos.	30
Tabela IV. Principais antocianinas em diferentes fontes naturais. Adaptado de ^{82, 93}	39
Tabela V. Código para as amostras preparadas via rota sol-gel com diferentes.....	54
extratos naturais e antibióticos utilizados como referência.....	54
Tabela VI. Atividade antimicrobiana dos extratos puros e dos antibióticos (Cloranfenicol, Gentamicina e Ampicilina) de referência, avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm) ^a	68
Tabela VII. Atividade antimicrobiana dos extratos encapsulados em sílica e dos antibióticos de referência, avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm) ^a ..	73
Tabela VIII. Atividade antimicrobiana das amostras de antocianinas encapsuladas avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm) ^a	75
Tabela IX. Atribuição das bandas obtidas no infravermelho para antocianina e encapsulado obtido via rota ácida e básica.....	82
Tabela X. Descrição do espectro de infravermelho de tanino e respectivos encapsulados	87
Tabela XI. Bandas obtidas no infravermelho para urucum e respectivo encapsulado (URU25A)	89
Tabela XII. Área específica, tamanho e volume de poro	90
Tabela XIII. Raio de giro (Rg), valor de P no nível 2 e raio da partícula (Rp).....	95
Tabela XIV. Temperaturas de degradação de tanino e antocianina e respectivos encapsulados	99
Tabela XV. Atividade antimicrobiana dos extratos puros e dos antibióticos (Cloranfenicol e Gentamicina) de referência, avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm) ^a	101

Tabela XVI. Descrição do espectro de infravermelho de ATA e ATB.....	102
Tabela XVII. Atividade antioxidante do extrato de antocianina e seus encapsulados.	104
Tabela XX. Espessura dos filmes e resultados do teste de tensão: força máxima e alongação de ruptura (direção axial) do filme controle e do filme indicador	109
Tabela XVIII. Parâmetros colorimétricos do filme indicador ativado e carne de peixe Tilápia após 5 dias de exposição com mudança de coloração total (ΔE)	112
Tabela XIX. Parâmetros colorimétricos do filme indicador ativado após 5 dias de exposição com.....	114
Índice Croma (*C).....	114

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Modelo de funções de embalagens. Adaptado de ¹⁴	18
Esquema 2. Frequência de publicações envolvendo as palavras-chaves “anthocyanin”, “fish”, “freshness indicator” e “packaging”. Fonte: www.sciencedirect.com. Acesso em 12 jan. 2015.....	26
Esquema 3. Estrutura química da quitina ou quitosana	27
Esquema 4. Estrutura química poli (álcool vinílico) (PVA).....	28
Esquema 5. Fórmula estrutural da curcumina. Adaptado de ⁴⁷	35
Esquema 6. Fórmula estrutural da bixina e norbixina.....	36
Esquema 7. Estrutura da oleuropeina. Adaptado de ⁹⁰	37
Esquema 8. Fórmula estrutural base da antocianina e respectivos radicais R e R'. Adaptado de ⁷⁴	38
Esquema 9. Formas estruturais da antocianina dependendo do pH e reação de degradação. Cátion flavílico (A), espécies quinoidais (B-D), pseudobase carbinol (E) e chalcona (F). Adaptado de ⁹⁸	41
Esquema 10. Taninos hidrolisáveis. Adaptado de ¹⁰⁶	43
Esquema 11. Fórmulas estruturais: a) um flavonóide genérico, b) flavan-3-ol e c) procianidina (tanino condensado). Adaptado de ¹⁰⁶	44
Esquema 12. Variação de acidez do silício e basicidade do oxigênio. Adaptado de ¹¹⁶	46
Esquema 13. Mecanismo para hidrólise e condensação de alcóxissilanos. Adaptado de ¹¹⁵	47
Esquema 14. Hidrólise catalisada por ácido. Adaptado de ¹¹⁵	48
Esquema 15. Hidrólise catalisada por base. Adaptado de ¹¹⁵	48
Esquema 16. Esquema geral de encapsulamento via processo sol-gel.....	53
Esquema 17. Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana	63
Esquema 18. Membrana bacteriana – Bactéria Gram-negativa. Adaptado de ⁹⁰	70
Esquema 19. Membrana bacteriana – Bactéria Gram-positivo. Adaptado de ⁹⁰	71
Esquema 20. Formas estruturais predominantes da antocianina em solução aquosa em diferentes faixas de pH. Adaptado de ²⁵	80
Esquema 21. Proposta de interações entre antocianina e a rede de sílica	83

Esquema 22. Estrutura da principal antocianina presente no bioativo antes da fragmentação (m/z 465 Da) à esquerda e após fragmentação (m/z 282 Da).	83
Esquema 23. Modelo de agregação de partículas primárias de secundárias	93
Esquema 24. Modelo de agregação dos clusters a) Fractal de massa b) Fractal de superfície	93
c) Estrutura de Porod. Adaptado de ¹²⁶	93
Esquema 25. Escala CIELab (Disponível em:< http://sellerink.com.br/blog/tag/modelo-cielab – Acesso em 08 dez. 2014>. Acesso em 11 jan. 2015).....	113

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, a cada ano, mais de dois milhões de pessoas morram por doenças diarreicas, muitas das quais adquiridas ao ingerir alimentos contaminados. Estima-se que as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) causem, anualmente, nos Estados Unidos (EUA), aproximadamente 76 milhões de casos, 325.000 hospitalizações e 5 mil mortes. No Brasil, faz-se a vigilância epidemiológica de surtos de DTA e não de casos individuais, com exceção da cólera, febre tifoide e botulismo. Essa vigilância (VE-DTA) teve início em 1999 e há registro médio de 665 surtos de DTA por ano, totalizando 13 mil doentes. No ano de 2012, por exemplo, foram 792 surtos ¹. Por essa razão, rege o desenvolvimento de novas estratégias para manutenção da qualidade de alimentos crus e processados, a fim de prevenir sua deterioração e evitar a disseminação de patógenos através da cadeia de processamento e distribuição de alimentos.

Devido às questões de toxicidade dos antimicrobianos e antioxidantes atualmente utilizados e à preferência dos consumidores por alimentos mais naturais e saudáveis, verifica-se atualmente um interesse crescente na busca por aditivos naturais capazes de preservar os alimentos das alterações indesejáveis ^{2, 3, 4}. Por essa razão, os aditivos naturais derivados de plantas tornaram-se um conveniente atrativo para a indústria alimentícia.

Compostos naturais, como óleos essenciais, quitosana, nisina ou lisozima estão sendo investigados como alternativas para substituição de conservantes sintéticos na obtenção de produtos com “selo verde”. Essa aplicação ainda é muito dificultada devido à interação dos produtos naturais com os ingredientes dos alimentos e mudanças nas propriedades organolépticas quando introduzidos nos mesmos ⁵. Além disso, a própria labilidade térmica característica desses materiais, limita a forma de aplicação desses compostos na indústria de alimento.

Dentre os compostos naturais de potencial aplicação por propriedades antioxidantes ou antimicrobianas encontram-se as antocianinas, taninos, urucum, curcumina e diversos extratos vegetais, como o de folha de oliveira.

A busca por um processo prático e viável de tratamento dos compostos naturais para aplicação na conservação de alimentos com resultados satisfatórios abre um campo de pesquisa a ser explorado. A imobilização desses materiais em matrizes de sílica representa uma rota viável de encapsulamento. Os xerogeis resultantes devem combinar características estruturais e texturais adequadas de forma a permitir a liberação controlada desses componentes.

Visando atender às necessidades de um mercado consumidor cada vez mais exigente e especificamente preocupado com a qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios, as embalagens inteligentes ^{6, 7} configuram-se como uma alternativa muito atrativa, pois indicam uma característica específica do alimento embalado para o consumidor e/ou fabricante, trazendo vantagens em relação à embalagens convencionais ^{8, 9}.

Dentre as embalagens inteligentes, as embalagens indicadoras de pH são uma alternativa interessante para a indústria de alimentos, especialmente para a de carne, peixe e frutos do mar, pois existe um interesse em desenvolver métodos para avaliação da frescor dos seus produtos, de tal forma que o próprio consumidor possa avaliar as condições de consumo mediante a indicação de alterações de pH do alimento ^{10,11,12}.

No tocante às embalagens ditas ativas, essas contem dispositivos capazes de prorrogar o tempo de vida de prateleira, através de liberação de materiais antibacterianos ou antioxidantes.

Um fator importante é que esses indicadores, como sendo uma parte integrante da embalagem do alimento, sejam compatíveis fisicamente e quimicamente com o polímero usado como matéria prima para desenvolvimento da embalagem. ¹² Sendo assim, polímeros naturais como quitosana, amido, pectina, e outros biopolímeros têm sido usados em embalagens para alimentos devido à biodegradabilidade, não toxicidade e propriedades biológicas ¹³.

Diante desse contexto surge o desafio de um estudo de viabilidade da incorporação um extrato natural com propriedades antimicrobianas e/ou antioxidantes encapsulado numa rede de sílica para manutenção de suas propriedades, em uma matriz polimérica para obtenção de uma embalagem ou etiqueta para alimentos com função preservante do alimento e indicadora de frescor do mesmo mediante variação de pH do meio.

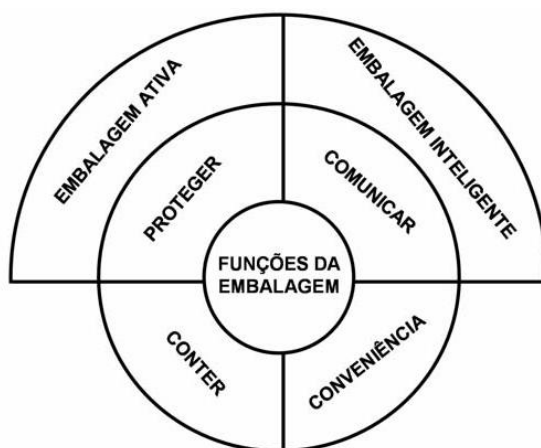
Assim, o presente trabalho está estruturado em quatro capítulos. O primeiro capítulo aborda uma revisão bibliográfica acerca dos temas: extratos naturais (curcumina, urucum, extrato de folha de oliveira, tanino e antocianinas) como aditivos para alimentos; processo sol-gel de síntese e embalagens inteligentes. Após são apresentados os objetivos dessa pesquisa. O capítulo seguinte destinado à metodologia descreve os materiais e os métodos utilizados para a realização dessa investigação. O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos, sua análise e interpretação e o capítulo 5 traz as conclusões finais diante dos resultados obtidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMBALAGENS INTELIGENTES

A função primária de toda embalagem de alimentos é proteger o conteúdo de alimentos contra danos físicos, ganho ou perda de umidade, oxidação e deterioração biológica para minimização das alterações químicas, bioquímicas e microbiológicas. A embalagem também favorece o marketing eficaz dos alimentos através de canais de distribuição e venda ¹⁴. Segundo a Portaria nº 42 do Ministério da Saúde (MS) de 1998 considera-se como embalagem primária, aquela que está em contato direto com os alimentos, e embalagem secundária aquela destinada a conter a(s) embalagem (ns) primária(s) ¹⁵.

Novas tecnologias em embalagens para alimentos têm sido desenvolvidas em resposta às demandas dos consumidores por qualidade e conveniência e a necessidade da indústria de maior garantia de preservação de seus produtos devido ao mercado globalizado. Embalagens de alimentos exigem também uma vida de prateleira, também conhecida do inglês como *shelf life*, mais longa juntamente com o monitoramento da sua qualidade para prolongamento das características do alimento ^{8, 16, 17}. Assim, surgiram os conceitos de embalagens ativas e de embalagens inteligentes. O Esquema 1 apresenta um modelo de funções das embalagens ^{8,14}.



Esquema 1. Modelo de funções de embalagens. Adaptado de ¹⁴.

Embalagens ativas interagem com o alimento ou modificam a atmosfera interna à qual o produto está exposto contribuindo para sua conservação, segurança e qualidade e/ou melhorando suas características sensoriais. Embalagens inteligentes são aquelas que, além de proteger, monitoram as condições do alimento em tempo real e reagem de alguma forma às mudanças em algumas das propriedades do alimento embalado, ou do ambiente que esse está exposto, em virtude da incorporação de indicadores ou sensores que produzem um sinal como resposta à qualquer alteração das condições iniciais da embalagem, dando informações ao fabricante e principalmente ao consumidor sobre o estado dessas propriedades e, portanto, da qualidade dos alimentos embalados ^{8, 18, 19}.

Os sistemas de embalagens inteligentes utilizam sensores ou indicadores, os quais são baseados na taxa de polimerização, difusão, reações químicas ou enzimáticas, para uma variedade de medições incluindo fluorescência para detecção de oxigênio gasoso, monitoramento de temperatura, por meio de indicadores de tempo-temperatura, compostos tóxicos, indicadores de maturação, integridade da embalagem, frescor via monitoramento de componentes específicos, e identificação do produto por rádio frequência e biosensores ^{19, 20}, conforme ilustra a Tabela I.

Tabela I. Exemplos de indicadores internos e externos e seus princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes. Adaptado de ⁸.

Técnica	Princípios/reagentes	Informação fornecida	Aplicação
Indicadores de tempo-temperatura (externos)	Mecânico, químico, enzimático	Condições de armazenamento	Alimentos armazenados sob refrigeração ou congelamento
Indicadores de oxigênio (interno)	Corantes, indicadores redox, corantes indicadores de pH, enzimas	Condições de armazenamento Vazamento da embalagem	Alimentos armazenados em embalagens com concentração de O ₂ reduzido
Indicadores de CO ₂	Químico	Condições de armazenamento Vazamento da embalagem	Embalagens de alimentos com atmosfera controlada ou modificada
Indicadores de maturação	Químico	Nível de maturação	Frutas, hortaliças
Indicadores de crescimento microbiano (interno/externo) e indicadores de frescor	Corantes, indicadores de pH, todo tipo de corantes indicadores na presença de certos metabólitos	Qualidade microbiana dos alimentos (Ex.: deterioração)	Alimentos perecíveis como carne, peixe e aves.
Indicadores patogênicos (internos)	Diversos métodos químicos e imunoquímicos reagentes com toxinas	Bactéria específica como <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Alimentos perecíveis como carne, peixe e aves.

Alguns fatores são importantes para aplicação extensiva de embalagens inteligentes: custo, robustez e compatibilidade com os diferentes materiais componentes da embalagem. Além disso, devem ser práticas, fáceis de usar e terem bom custo-benefício.

Há algumas razões motivadoras para os consumidores pagarem pelo valor agregado adicional fornecido por indicadores de frescor em embalagens para alimentos. Primeiro, consumidores em todo o mundo estão tornando-se mais atentos para os fatores que influenciam o frescor dos alimentos e sua salubridade. Segundo os indicadores de frescor proporcionam benefício quanto à segurança, especialmente para certos segmentos da população consumidora. Pessoas podem adoecer quando consomem alimentos que contenham microrganismos acima dos níveis permitidos. Então, indicadores de frescor podem ser usados para minimizar parte das negligências que ocorrem na cadeia de suprimentos através da detecção e revelação de possíveis motivos promotores de crescimento de microrganismos patogênicos. Jovens, mulheres grávidas e idosos são grupos de risco na maioria dos

casos de surtos de contaminação microbiana. Os consumidores ainda consideram útil os indicadores para avaliação da validade dos produtos em seus lares ²¹.

Portanto, indicadores de frescor destacam-se no monitoramento da qualidade dos alimentos embalados reagindo a mudanças que ocorrem no produto alimentar como resultado do crescimento microbiológico.

Um pré-requisito necessário para o sucesso no desenvolvimento de indicadores de frescor para embalagens de alimentos é o conhecimento dos metabólitos indicadores de qualidade, que podem ser, por exemplo, produtos voláteis de origem microbiana, tais como dióxido de carbono, compostos nitrogenados, aminas biogênicas, toxinas, bem como as próprias bactérias patogênicas ²².

Apesar de existir uma pesquisa ativa nessa área, as aplicações comerciais de sistemas inteligentes têm sido principalmente limitadas ao uso de indicadores visuais de tempo-temperatura, indicadores de oxigênio e indicadores de frescor conforme ilustra a Tabela II.

Tabela II. Exemplos de indicadores internos e externos e seus princípios de funcionamento utilizados em embalagens inteligentes comercialmente disponíveis. Adaptado de ²³.

Fabricante	Nome comercial	País
Indicadores de tempo-temperatura		
Lifelines Technology Inc.	Fresh-Check	USA
Trigon Smartpack Ltd	Smartpack	Reino Unido
3M Packaging Systems Division	MonitorMark	USA
Visual Indicator Tag Systems	Vitsab	Suécia
Timestrip	Timestrip Complete	USA
Vitsab International	CheckPoint	-
Freshpoint Holding SA	CoolVu Food	Suíça
Innolabel	Innolabel Timestrip	Bélgica
Indicadores de oxigênio		
Mitsubish Gas Chemical	Ageless Eye	Japão
Toppan Printing Co.	Freshilizer C e CW	Japão
Toagosei Chem. Industry Co.	Vitalon G	Japão
Multisorb Technologies	Freshpax M	USA
Indicador de frescor		
FreshTag B.V.	FreshTag	USA
RipeSense Limited	RipeSense	Nova Zelândia

As razões para isso devem ser o custo elevado para fabricação de um rótulo indicador, restrições legislativas e até mesmo a aceitação de varejistas e

proprietários de marcas. Além disso, os indicadores podem revelar problemas ocorridos na gestão ou durante a cadeia de processamento do produto.

As questões de inocuidade relacionadas aos indicadores colocados no interior da embalagem primária, seja para o contato direto com a atmosfera circundante do alimento ou com o alimento em si são muito importantes devido ao potencial de migração indesejável de componentes químicos sintéticos aos alimentos.

Devido ao fato da deterioração dos alimentos geralmente estar acompanhada por uma mudança do pH, a inviabilidade do consumidor detectar e conhecer qual o pH adequado de um alimento um sistema de embalagem que muda de cor com a alteração do pH do alimento embalado poderia permitir ao consumidor avaliar seu frescor e qualidade, sem a necessidade de abrir a embalagem no próprio local de compra^{9, 10}.

2.1.1 Indicador de frescor e pH

Um indicador pode ser definido como uma substância que indica a presença ou ausência de outra substância ou o grau de reação entre duas ou mais substâncias por meio de uma mudança característica, especialmente coloração. Ao contrário dos sensores, os indicadores transmitem a informação através de uma mudança visual de maneira direta¹⁰.

Indicadores de frescor são utilizados para indicar se a qualidade do produto foi prejudicada devido à exposição a condições desfavoráveis durante o armazenamento e/ou transporte favorecendo crescimento microbiano ou alterações químicas intrínsecas ao produto. Dessa forma, a embalagem é geralmente equipada com um indicador visual que reage com os metabólitos gerados pela ação microbiana determinando-se assim a qualidade microbiológica do alimento¹¹.

Por sua vez, indicadores visuais são substâncias capazes de mudar de cor dependendo das características físico-químicas da solução na qual estão contidos, em função de diversos fatores, tais como pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos e adsorção em sólidos.

Dentre os indicadores visuais destacam-se os indicadores ácido-base ou indicadores de pH: substâncias orgânicas fracamente ácidas (indicadores ácidos) ou

fracamente básicas (indicadores básicos) que apresentam cores diferentes para suas formas protonadas e desprotonadas. Isso significa que mudam de cor em função do pH. Quando adicionados a uma solução, os indicadores ligam-se aos íons H_3O^+ (meio ácido) ou OH^- (meio básico) e a ligação desses íons provoca uma alteração na configuração eletrônica desses indicadores e conseqüentemente causa alteração de suas cores ²⁵.

Segundo a Resolução RDC n° 14, de 28 de março de 2014 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) ²⁶, considera-se alimento deteriorado todo alimento que apresenta alterações indesejáveis das características sensoriais e/ou físicas e/ou químicas, em decorrência da ação de microrganismos e/ou por reações químicas e/ou alterações físicas. A formação de diferentes metabólitos indicadores do processo de deterioração nos alimentos é dependente do tipo de produto, das condições de armazenamento e do tipo de embalagem. Por exemplo, aminas biogênicas, tais como histamina, putrescina, tiramina e cadaverina têm sido identificadas como indicadores de decomposição de produtos cárneos ²⁷.

Devido às preocupações toxicológicas associadas com estes compostos e ao baixo impacto na qualidade sensorial, o desenvolvimento de indicadores eficazes de bases nitrogenadas voláteis seria de grande benefício para o consumidor de carne de peixe visto que esse alimento está entre os alimentos mais consumidos no mundo e é muito suscetível à deterioração microbiana causando aumento do pH do peixe. Então, um sistema barato, preciso, simples e confiável que visualmente indica a degradação da carne de peixe pode ser desenvolvido ²⁸.

Um exemplo de sistema de detecção de aminas voláteis foi descrito por Miller, Wikes e Conte, (1999) e patenteados como Tecnologia COX "FreshTag", são etiquetas indicadoras de cor que consistem de uma pequena etiqueta fixada na parte externa da embalagem. Consiste de um pavio que reage na presença de aminas voláteis formadas no processo de degradação do peixe e outros produtos do mar, contido dentro de um *chip* de plástico. Estas aminas entram em contato com o reagente presente no pavio da etiqueta fazendo com que a mesma adquira coloração rosa brilhante. O produto foi descontinuado em 2004 ¹⁰.

Em 2007, o Instituto Internacional de Qualidade de Sensores para Alimentos em parceria com uma empresa privada anunciou o desenvolvimento do SensorQ, um indicador de pH baseado em antocianinas, capaz de informar sobre a formação

de amins biogênicas originadas no processo de degradação de carnes e aves embaladas.

Existe ainda tecnologia desenvolvida mais recentemente como a do Centro de Pesquisa Tecnológica da Finlândia juntamente com UPM Raflatac que trata-se de um indicador de frescor para carne de aves domésticas baseado em uma nanocamada de prata que reage com H_2S , um produto de degradação da cisteína. O indicador tem coloração marrom claro no momento do embalamento do alimento, mas em contato com o gás sulfídrico forma-se o sulfeto de prata e ocorre descoloramento. Os indicadores SensorQ e Raflatac ainda não estão disponíveis para comercialização ²⁹.

Indicadores patogênicos como o desenvolvido para detecção da enteroxina produzida pela *Escherichia coli* O157:H7 composto de moléculas de polidiacetileno reticulado que podem ser incorporadas a embalagem foi um grande avanço de pesquisa nessa área. À medida que a toxina se liga às moléculas, a cor do filme muda permanentemente para do azul para o vermelho ^{14, 22}.

O uso de corantes (exemplo azul de bromotimol) como indicadores de pH para controlar a formação de dióxido de carbono, devido ao crescimento microbiano é uma das aplicações mais frequentes da indústria de embalagens de alimentos (HAN; HO; RODRIGUES, 2005). Outros corantes indicadores de pH incluem o azul de xilenol, púrpura de bromocresol, vermelho de cresol, vermelho de fenol e alizarina. Além do dióxido de carbono, outros metabólitos (tais como SO_2 , NH_4 , amins voláteis e ácidos orgânicos) têm sido utilizados como moléculas alvo de monitoração para indicadores sensíveis ao pH ³⁰.

Efetivamente, dentre os produtos de origem animal, o pescado é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração, em decorrência dos métodos de captura, ao pH próximo da neutralidade, à elevada atividade de água nos tecidos, ao elevado teor de nutrientes (proteína) disponíveis para microorganismos, ao teor de lipídios insaturados, à rápida ação destrutiva das enzimas naturalmente presentes nos tecidos, aos inúmeros microorganismos presentes nas águas e a alta atividade metabólica da microbiota ³¹.

Neste contexto, os benefícios nutricionais deste grupo alimentar só podem ser aproveitados quando os fatores segurança e qualidade forem garantidos, tornando-se fundamental o emprego de ferramentas que possam agir na contenção dos

mecanismos de deterioração, como o emprego da cadeia do frio em todas as etapas do seu processamento ³².

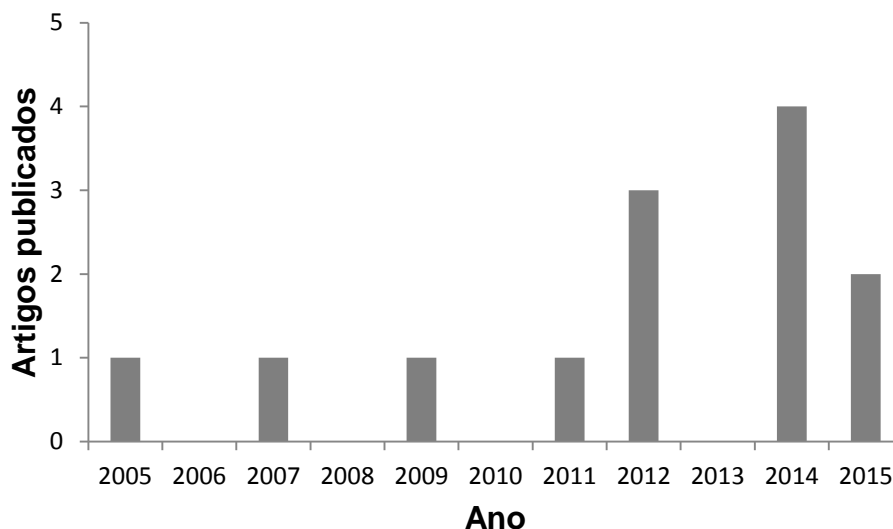
Um sensor de mudança de cor foi relacionado à concentração de aminas, no início da degradação microbiana no espaço livre da embalagem, e também relacionado a mudanças em populações microbianas não-patogênicas de peixes frescos inteiros (*Gadus morhua* e *Merlangius merlangus*). Aminas voláteis, tais como trimetilamina (TMA), amônia (NH₃) e dimetilamina (DMA) conhecidas como Nitrogênio Básico Volátil Total (N-BVT), são as substâncias responsáveis pelo odor e sabor característico de peixes no início de sua degradação microbiana ^{11, 33}.

Os sistemas indicadores de frescor para pescado desenvolvidos nos últimos anos não são amplamente disponíveis na literatura e o assunto ainda é limitado. Heising e colaboradores desenvolveram um método não destrutivo para monitorar mudanças no frescor de peixes embalados. O princípio desse método é que em fase aquosa, mudanças na concentração de amônia podem ser monitoradas por um eletrodo de íon seletivo. O estudo usou filetes de bacalhau para desenvolvimento do projeto ³⁴.

Outro trabalho nessa área foi o desenvolvimento um sistema optoeletrônico fácil de usar para avaliação do tempo de prateleira de lula (fruto do mar) sob refrigeração, através de um nariz artificial colorimétrico. Os corantes utilizados foram púrpura de bromocresol, azul de bromofenol, sal sódico de azul de bromotimol, timol e complexo de ródio dinuclear de fórmula cis-[Rh₂(C₆H₄PPh₂)₂(O₂CCH₃)₂](HO₂CCH₃)₂, e os materiais sensíveis para o nariz artificial foram obtidos pela mistura desses com uma suspensão de óxido de alumínio ou sílica gel em solvente apropriado. Foi observado a mudança de coloração dos materiais frente à atmosfera de produtos de deterioração do alimento composta por aminas voláteis ³⁵.

Silva-Pereira (2015) e colaboradores desenvolveram um filme à base de quitosana/amido de milho com extrato de repolho roxo (antocianinas) como indicador visual de degradação de peixe. Todos esses materiais são considerados baratos e obtidos de fontes renováveis além de apresentar a vantagem de serem biocompatíveis e não-tóxicos, o que é muito importante na indústria de alimentos. Apesar de apresentar uma boa resposta e sensibilidade os pesquisadores colocam como campos ainda a serem explorados o estudo de resposta do filme a variações de temperatura e a estabilidade do extrato no indicador ²⁸.

Entre os indicadores de frescor para pescado baseado em mudança de pH com antocianinas, há poucas publicações conforme ilustra a Esquema 2.



Esquema 2. Frequência de publicações envolvendo as palavras-chaves “anthocyanin”, “fish”, “freshness indicator” e “packaging”. Fonte: www.sciencedirect.com. Acesso em 12 jan. 2015..

2.1.2 Materiais biocompatíveis

A utilização de polímeros naturais na formação de embalagens flexíveis vem sendo intensamente estudada em âmbito mundial, visando substituição parcial dos polímeros sintéticos, principalmente devido ao problema ambiental de acúmulo de lixo de difícil degradação ³⁶.

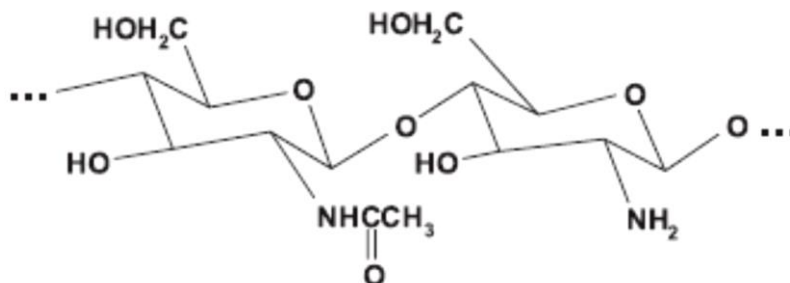
Os polímeros biodegradáveis naturais podem ser derivados de quatro fontes principais: animal (colágeno/gelatina), frutos do mar (quitina/quitosana), microbiana (ácido polilático ou PLA e polihidroxialcanoatos ou PHA) e origem agrícola (lipídios e hidrocolóides, proteínas e polissacarídeos) ³⁷.

Dentre esse biopolímeros a quitosana constitui uma classe emergente com aplicação em vários campos inclusive no desenvolvimento de embalagens para alimentos através da preparação de filmes. Isso se deve a sua não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar filmes flexíveis e

resistentes, com barreira eficiente a oxigênio, além de apresentar atividade antimicrobiana³⁸.

A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos etc., composto pelas unidades monoméricas de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose.

Este polímero natural possui uma estrutura cristalina altamente organizada. Dessa forma, é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química. A insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização³⁶. O Esquema 3 mostra a estrutura das unidades méricas da quitina ou quitosana, dependendo do grau de desacetilação. A quitosana é um biopolímero cujo grau de desacetilação, distribuição de massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais de matéria-prima e dos métodos de preparação.



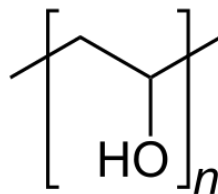
Esquema 3. Estrutura química da quitina ou quitosana

Este biopolímero pode facilmente se dissolver em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epiclorigrina, são usados para aumentar a sua estabilidade química e a resistência mecânica³⁹.

A resistência mecânica e a maleabilidade da quitosana são limitadas, e por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse.

Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas utiliza-se a mistura da mesma, com outros hidrogéis poliméricos sintéticos, tais como o poli (álcool vinílico) (PVA), bem como com agentes reticulantes, que permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes através de um processo físico de interação ⁴⁰.

O PVA (Esquema 4) é um polímero produzido pela polimerização do acetato de vinila seguida de reação de hidrólise do poli (acetato de vinila) em poli(álcool vinílico). A relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de radicais ácido acético representa o grau de hidrólise (GH) do PVA.



Esquema 4. Estrutura química poli (álcool vinílico) (PVA).

O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e ser biocompatível ⁴⁰.

Portanto, a mistura dos polímeros quitosana e PVA forma uma blenda resultante de um processo físico de mistura de malhas, sem reação química e conseqüentemente sem formação de ligações entre ambos compostos com o objetivo de otimizar as propriedades da quitosana que como já mencionado apresenta baixa resistência à ruptura.

Desta forma, o desenvolvimento de materiais baseados em ingredientes naturais para embalagens inteligentes com indicadores de frescor e ação antioxidante e antimicrobiana, atribuídas pela adição de antocianinas e/ou outras biomoléculas, apresenta-se como uma alternativa com potencialidade de suprir as perspectivas de interesse industrial e científico, como: conservação de alimentos, minimização do uso de aditivos sintéticos incorporados ou em contato direto aos alimentos (perigo químico-toxicológico) além de minimização de desperdício na

cadeia de suprimentos de alimentos pelo aumento do controle de validade dos mesmos.

No entanto, a busca por um processo prático e viável de tratamento dos compostos naturais para aplicação na preservação de alimentos com resultados satisfatórios abre um campo de pesquisa a ser explorado. A imobilização desses materiais em matrizes de sílica representa uma rota viável de encapsulamento. Os xerogéis resultantes devem combinar características estruturais e texturais adequadas de forma a permitir a liberação controlada desses componentes.

Diante desse contexto, a presente pesquisa visa através da técnica sol-gel de encapsulamento de materiais, responder a seguinte questão: “Qual a viabilidade de encapsular extratos naturais, em matrizes de sílica para aplicação na conservação de alimentos?”

2.2 Estado-da-arte

A Tabela III ilustra a aplicação de produtos naturais em alimentos como aditivos para conservação de alimentos pesquisados nos últimos 10 anos.

Tabela III. Exemplos de produtos naturais empregados como aditivos em alimentos.

Produto natural	Escopo/matriz	Comentários	Resultados	Referência
Betaciclodextrina e complexo trans-cinnamaldeído	Mamão fresco	Ativos microencapsulados e incorporados em revestimento comestível de quitosana e pectina multicamada.	Extensão de vida de prateleira de <7 dias para 15 dias.	41
	Óleo de cinamomo	Embalagem contendo o óleo combinado com MAP ¹	Aumento da vida de prateleira	42
Tomilho e orégano	Alface e cenoura pronta para comer	Banho com os produtos	Tempo de preservação para 7 dias	43
	empacotadas em embalagem de PP			
Quitosana	Morangos	Solução a 1%	Inibição do crescimento de microorganismos	44
	Cogumelos	Revestimento de quitosana 5, 10 e 20g/L	A 4°C, por 15 dias, o filme de 20g/L de quitosana inibiu o crescimento bacteriano	45
	Ricota	Revestimento quitosana e proteína do soro do leite	Diminuição da atividade microbiana em relação à amostra controle	46
	Brócolis	Revestimento comestível de quitosana e CMC (carboximetilcelulose)	Retarda perda de peso, amarelamento, amarronzamento reduzindo crescimento bacteriano e aumenta a retenção de ácido ascórbico e clorofila.	47
Óleo de eucalipto e óleo de limão	Queijo	Tratamento com 7% óleo de eucalipto e 25% óleo de limão	Impacto positivo na preservação nutricional, sensorial e microbiana	48
	Nisina	100IU ² /mL e 500IU/mL de nisina	Efetivo na redução da contagem de <i>S. aureus</i> .	49
Timol	Salada Caprese embalada (fatias de mussarela búfalo, tomate, manjeriço) sob MAP	Banho de solução a 400ppm	Diminuição da população de coliformes de 5,65 para 4,23 log CFU/g e aumento da vida de prateleira de 3,77 dias para 12 dias. Diminuição da concentração de <i>Pseudomonadaceae</i> .	50
	Carne moída embalada sob MAP	250, 500, 750mg/kg	Vida de prateleira de 7 dias	51
	Camarão limpo e embalado sob MAP	Revestimento com tymol 500, 1000, 1500ppm	Vida de prateleira de 5 dias para 14 dias	52
Natamicina	Queijo Gorgonzola	Filme com 2 e 4% de natamicina incorporada no processo de produção do queijo	Resultado satisfatório para inibição do <i>P. roquefortii</i>	53
Óleo essencial de sálvia	Carne moída misturada com proteína de soja	0,1, 0,3 e 0,5%	A conc. de 0,5% controlou o desenvolvimento dos principais microorganismos	54
Extrato de alecrim, groselha, aipo	Almôndega	0,2 % a 10°C	Extrato de alecrim foi o mais efetivo.	55
Extrato de alecrim	Produto à base de peixe	0,4 e 0,8% do extrato em combinação com vácuo	Combinação apresentou resultados positivos para controle microbiano	56
Óleo de orégano	Salsicha fresca		Efeito bacteriostático	57
Óleo de manjerona	Salsicha fresca		Efeito bacteriostático	58
Óleo de orégano	Produto base de peixe	0,2, 0,4% do óleo sob vácuo	Aumento da vida de prateleira de 5 dias para 12 dias	59
Óleo essencial de tomilho	Produto base de peixe	0,2%	Aumento da vida de prateleira de 6 dias para 17 dias sob MAP	60

Elagitanino			Inibição das bactérias <i>Staphylococcus</i> e <i>Salmonella</i>	61
Antocianinas			Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positiva e Gram negativa	62
Tanino			Atividade antimicrobiana de polifenóis (taninos)	63
Tanino			Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positiva, Gram negativa e fungos	64
Curcumina		Obtenção de nanopartículas de curcumina para aumento de solubilidade.	Atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , e <i>P. Aeruginosa</i> .	65
Urucum	Bactérias Gram positiva e Gram negativa.	Solução etanólica das folhas e sementes da <i>B. orellana</i> .	Extrato de folhas: potencial antibacteriano contra <i>S. aureus</i> . Extrato das sementes: inibição forte contra <i>E. coli</i> e <i>B. cereus</i> .	66
Extrato de oliva	Carne de gado e carne de porco pré-cozidas.	Extrato aquoso do resíduo do bagaço do óleo de oliva.	Inibição de oxidação lipídica tanto na carne de gado quanto na de porco.	67

¹MAP significa Modified Atmosphere Pack (Embalagem em atmosfera modificada) formada por 60% de O₂, 30% N₂ e 10% O₂

²Trata-se de uma unidade de medida *International Unit* (IU), definido pela United States Pharmacopeia, e baseado em medidas de atividade biológica.

De acordo com a Tabela III a maioria dos sistemas são óleos essenciais extraídos de alecrim, manjerona, orégano, eucalipto, tomilho, limão, sálvia e cinamomo incluindo extratos de frutas e plantas como, groselha, alecrim, oliveira, tanino, curcumina, urucum e antocianinas. Os alimentos conservados com esses extratos naturais são geralmente queijos, frutas, verduras e legumes frescos e carnes em que o teor empregado dos mesmos varia desde 0,020 % a 25 % conforme o tipo de aplicação (solução, revestimento comestível, filme e encapsulamento). O aumento da vida de prateleira depende do aditivo natural e do alimento, podendo inclusive chegar a um incremento de 9 dias.

Dentre os compostos naturais destacados no estado-da-arte tornam-se objeto de estudo o tanino, o urucum, o extrato de oliva, a cúrcuma ou curcumina e as antocianinas por conferirem baixa alteração nas propriedades organolépticas (gosto e odor) nos alimentos quando em contato, pela solubilidade em água, ou seja, compatibilidade com alimentos e pela disponibilidade de amostras, devido elevada produção por empresas brasileiras como a TANAC S.A (tanino) localizada em Montenegro no Rio Grande do Sul e Chr Hansen Brasil (corantes para alimentos – antocianinas e urucum) localizada em Valinhos em São Paulo.

Com produção menos expressiva a cidade de Mara Rosa em Goiás constitui um dos principais centros produtores do Brasil de rizomas de cúrcuma e os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais do plantio de oliveiras pela necessidade de clima ameno para melhor desenvolvimento.

2.3 EXTRATOS NATURAIS – ALTERNATIVA COMO ADITIVOS PARA ALIMENTOS

Segundo a Portaria nº 540 – SVS/MS de 27/10/1997, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento ⁶⁸. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não

inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

A segurança dos aditivos é primordial. Isto supõe que antes de ser autorizado o uso de um aditivo em alimento este deve ser submetido a uma adequada avaliação toxicológica, uma vez que se deve levar em conta, entre outros aspectos, qualquer efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso. Os aditivos alimentares devem ser mantidos em observação e reavaliados, quando necessário, caso se modifiquem as condições de uso. As autoridades competentes devem ser informadas sobre dados científicos atualizados do assunto em questão ⁶⁸.

O emprego de aditivos justifica-se por razões tecnológicas, sanitárias, nutricionais ou sensoriais, sempre que: sejam utilizados aditivos autorizados em concentrações tais que sua ingestão diária não supere os valores de ingestão diária aceitável (IDA) recomendados; atenda às exigências de pureza estabelecidas pela FAO-OMS, ou pelo Food Chemical Codex ⁶⁸.

A autoridade brasileira para segurança de alimentos é a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dessa forma, os documentos regulatórios para controle de aditivos para alimentos e materiais permitidos para seu acondicionamento disponíveis são: Portaria N^o 540 - SVS/MS, de 27/10/1997 ⁶⁸; Listas Positivas de Monômeros e Polímeros: GMC n. 02/2012 ⁶⁹ e RDC n. 56/2012 ⁷⁰; Lista Positiva de Aditivos: GMC n. 32/07 ⁷¹ e RDC n.17/2008 ⁷²; Regulamento para Corantes e Pigmentos (aminas aromáticas não sulfonadas e metais e metalóides): GMC n. 15/10 ⁷³ e RDC n.52/2010 ⁷⁴; RDC n. 45, de 03/11/2010 ⁷⁵; Resolução - CNNPA N^o 44, de 1977 ⁷⁶.

Órgãos estrangeiros como, por exemplo, a autoridade americana para segurança de alimentos – FDA (*Food and Drug Administration*) embora também inexistam regras específicas para as substâncias ativas e inteligentes. Além do FDA, a autoridade europeia para segurança de alimentos EFSA (*European Food Safety Authority*) dispõe de uma base de dados com a lista de aditivos aprovados para uso em alimentos.

Existe um regulamento da Comissão da Comunidade Européia (EU 10/201), relativo aos materiais plásticos para contato direto com os alimentos – Listas Positivas de Aditivos, monômeros e outras substâncias iniciadoras, adjuvantes de polimerização e um regulamento específico para Embalagem Ativa (Regulamento

EC n. 450/2009). Esses documentos poderão nortear as escolhas ou para avaliar a potencial aplicação de um dado indicador ou aditivo no mercado.

Dentre as 20 categorias de aditivos destacam-se para avaliação da presente pesquisa as funções: antioxidante (substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento); corante (substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento) e conservador (substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas)⁶⁸.

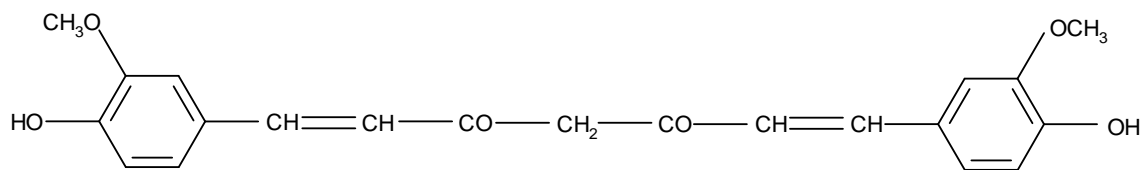
A utilização de corantes em alimentos não apresenta nenhum interesse nutritivo, pois a única preocupação é proporcionar uma melhor apresentação do produto, porém deve-se considerá-los como aditivos alimentares que uniformizam a coloração de um alimento⁷⁷.

A lista positiva de corantes para adição em alimentos e bebidas no Brasil é estabelecida pela Resolução CNNPA Nº 44, de 1977 que é composta de 48 corantes divididos em quatro categorias: corante orgânico natural; corante orgânico sintético artificial; corante orgânico sintético idêntico ao natural e corante inorgânico (pigmentos).

Os corantes orgânicos naturais permitidos são: curcumina, riboflavina, cochonilha ou ácido carmínico, urzela ou orceína ou oreína sulfonada, clorofila, caramelo, carvão medicinal, carotenoides (alfa, beta, e gama-caroteno; bixina e norbixina; capsantina e capsorubina; licopeno), xantofilas (flavoxantina e luteína; criptoxantina; rubixantina; violaxantina; rodoxantina; cantaxantina); vermelho de beterraba ou betanina e antocianinas (pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina). Todos os corantes naturais, salvo a cochonilha são de origem vegetal, podendo ser compostos puros ou produtos de extração⁷⁷.

2.3.1 Cúrcuma ou curcumina

A curcumina é dos constituintes do curry e é extraída da trituração dos rizomas da *Curcuma longa*, o açafrão, planta da família das Zingiberáceas cultivadas no Extremo Oriente e Madagascar. Trata-se de um pó amarelo alaranjado insolúvel em água e em éter, pouco solúvel em etanol e em ácido acético glacial mas solúvel em meio básico. Apresenta peso molecular 368,4 g.mol⁻¹, fórmula bruta C₂₁H₂₀O₆ e fórmula estrutural conforme Esquema 5.

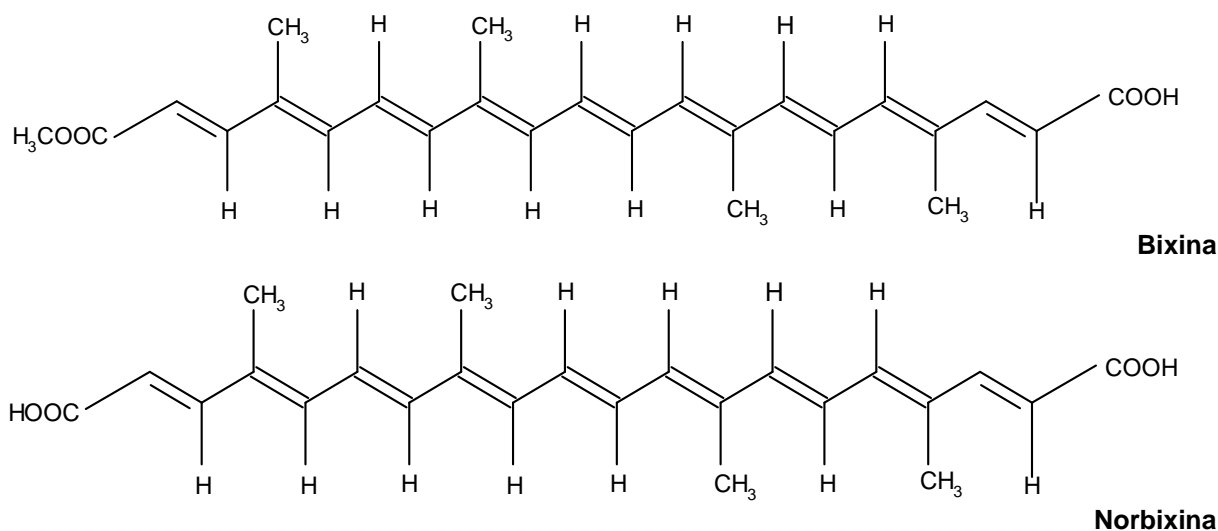


Esquema 5. Fórmula estrutural da curcumina. Adaptado de ⁴⁷.

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) tem sido muito utilizada na indústria alimentícia, como corante, aromatizante e como ingrediente no preparo de temperos, laticínios e pratos prontos ^{78,79,80}. De acordo com Gul e colaboradores, a cúrcuma inibi de forma significativa o crescimento *in vitro* de algumas bactérias, como o *Staphylococcus aureus*, no entanto, não inibi *Escherichia coli* ⁸¹. Uma fraca atividade antibacteriana foi verificada por Singh e colaboradores ⁸² e Tønnesen & Karlsen ⁸³ para a cúrcuma em relação a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis*, e *Salmonella typhimurium*. A atividade antimicrobiana da cúrcuma tem sido associada aos pigmentos curcuminóides. Entretanto, a cúrcuma em pó contém, além dos pigmentos, os óleos essenciais que também apresenta atividade antimicrobiana ⁸⁴.

2.3.2 Urucum (Bixina e Norbixina)

Bixa orellana L., popularmente conhecida como “urucum” tem sido usada por comunidades indígenas no Brasil e em outros países tropicais para várias aplicações biológicas. O urucum pertence á classe dos carotenoides e apresenta coloração amarela e laranja quando em solução. O material principal de coloração dos extratos de urucum é o carotenoide bixina. Bixina é o éster monometil da norbixina. Norbixina é um ácido carboxílico simétrico em que seu material principal de coloração é o seu sal alcalino ^{85,86}. A bixina e a norbixina apresentam fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$ e $C_{24}H_{28}O_4$ e massa molecular $394,52 \text{ g.mol}^{-1}$ e $380,48 \text{ g.mol}^{-1}$ respectivamente e fórmulas estruturais apresentadas no Esquema 6.



Esquema 6. Fórmula estrutural da bixina e norbixina

Extrato de urucum em óleo e em solução aquosa é obtido pela extração do pericarpo da fruta *Bixa orellana*. O extrato aquoso é obtido utilizando-se soluções de hidróxidos de metal alcalino seguido de isolamento das estruturas de interesse (bixina e norbixina).

A bixina é insolúvel em água, fracamente solúvel em etanol e solúvel em éter e óleos. O seu ponto de fusão é em torno de 198°C⁸⁵.

Estudos com *Bixa orellana* L. (urucum) relatam sua atividade antimicrobiana, demonstrando a capacidade preservativa desta planta na conservação e agregação de qualidade aos alimentos^{87,88}.

2.3.3 Extrato de oliva

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta da família botânica *Oleaceae*, sendo a única da espécie que origina frutos comestíveis. Estudos revelam que o chá da folha de oliveira apresenta potente ação moduladora de radicais livres, ação anticancerígena e antimicrobiana. Nas folhas e frutos da oliveira, o principal composto fenólico é a oleuropeína, um glucosídeo do ácido elenólico, esterificado pelo hidroxitirosol e que durante a produção do azeite ocorrem reações de oxidação

Estudos realizados por Pereira e colaboradores demonstraram que o extrato de folha de oliveira tem ação antibacteriana e antifúngica contra os microorganismos *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. neoformans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*. Isso deve-se provavelmente a presença de compostos fenólicos na sua composição, particularmente a oleuropeína e hidroxitirosol⁹⁵.

A oleuropeína inibe ou retarda o crescimento de uma série de bactérias e fungos. Em geral, esse composto pode ser usado como aditivo em alimentos⁹⁰.

2.3.4 Antocianina

As antocianinas constituem um grupo de pigmentos hidrossolúveis, amplamente distribuído nos vegetais, responsáveis pela coloração vermelha, azul ou violeta de várias flores.

No estado natural, as antocianinas são glicosídeos de sais de 2-fenilbenzopirílium; a maior parte são derivados hidroxilados e contêm agliconas de antocianinas chamadas antocianidinas: pelargonidina, cianidina, peronidina, delphinidina, petunidina, malvidina.

Essas diversas antocianidinas diferem apenas pela natureza dos radicais R e R' ligados no anel benzênico^{77,85} conforme Esquema 8 abaixo:

	Pelargonidina	Cianidina	Peonidina	Delfinidina	Petunidina	Malvidina
R	-H	-OH	-O-CH ₃	-OH	-O-CH ₃	-O-CH ₃
R'	-H	-H	-H	-OH	-OH	-O-CH ₃

Esquema 8. Fórmula estrutural base da antocianina e respectivos radicais R e R'. Adaptado de⁷⁴.

As antocianinas são obtidas pela extração com água, com metanol ou etanol a partir de vegetais e frutos comestíveis. Durante o processo de extração pode ser adicionado como regulador de pH e estabilizador um ácido comestível ou uma solução aquosa de sulfito. A maior parte dos açúcares fermentam formando álcool. O extrato pode ser concentrado por evaporação no qual o álcool é eliminado.

Todas as antocianinas são solúveis em água e são encontradas em diferentes fontes na natureza como pigmento conforme indicado na Tabela IV.

Tabela IV. Principais antocianinas em diferentes fontes naturais. Adaptado de ^{82, 93}.

Antocianidina	Fonte como pigmento
Pelargonidina	Morango, amora, rabanete vermelho
Cianidina	Pêssego, repolho roxo, cerejas, ameixa, amora preta, groselha, cebola roxa
Delfinidina	Mirtilo, berinjela, groselha, uva (<i>Vitis vinífera</i>),
Petunidina	Uva
Malvidina	Uva

Antocianinas apresentam ponto de fusão compreendido entre 300 e 350°C. As antocianinas são muito sensíveis às variações de pH: geralmente vermelho em meio ácido, tornando-se violeta e depois azul escuro quando pH alcalino; do mesmo modo a presença de oxigênio é um fator importante de instabilidade. A elevação da temperatura produz descoloração. A presença de metais, enfim, modifica a estabilidade das antocianinas ⁷⁷.

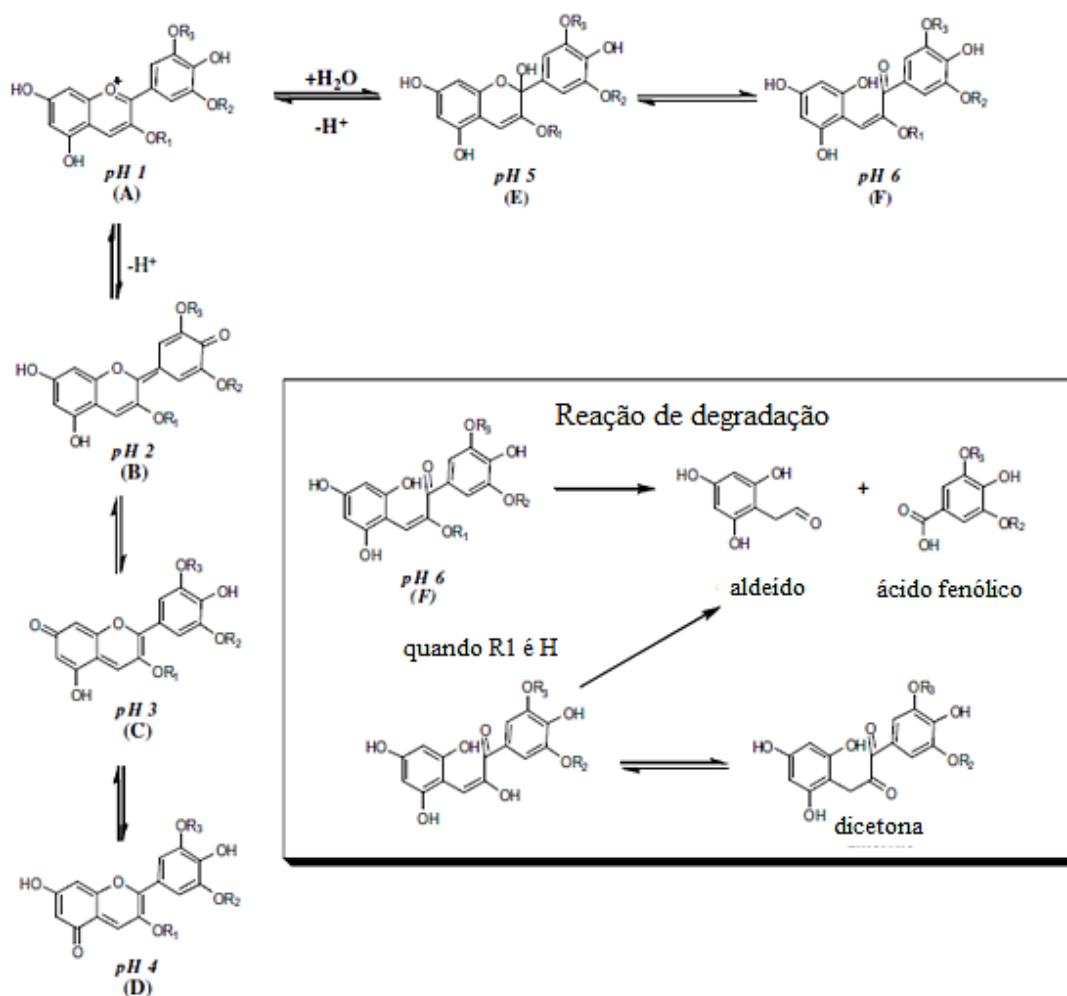
Vários estudos têm sugerido que as antocianinas são um potente antioxidante comparado com antioxidantes clássicos como butilato hidroxil anisol, butilato hidroxil tolueno, alfa tocoferol (vitamina E) e vitamina C. Este agente natural, quando adicionado a alimentos, além de conferir a coloração aos alimentos, propicia a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos. Esses compostos são capazes de capturar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio fenólico ^{97, 98}.

No extrato de antocianina obtido da casca da uva há predominância de compostos fenólicos. Esses compostos são conhecidos por sua habilidade de

danificar as células microbianas devido à alteração da permeabilidade seletiva da membrana plasmática conduzindo a um extrusamento das substâncias intracelulares⁹⁹. Geralmente, as antocianinas são ativas contra diferentes microorganismos. No entanto, as bactérias gram positivas são mais suscetíveis à ação desses compostos que gram negativas¹⁰⁰.

Em solução aquosa, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio conforme apresenta o Esquema 9. Em pH 1 o cátion flavílico (A) é a espécie predominante e contribui para o aparecimento das cores vermelho e púrpura. Em valores de pH entre 2 e 4 as espécies quinoidais (B-D) são predominantes (azul). Em valores de pH entre 5 e 6 somente duas espécies incolores são observadas, a pseudobase carbinol (E) e a chalcona (F), respectivamente. Já em pH superior a 7 as antocianinas são gradualmente degradadas (reação de degradação) dependendo de seus grupos substituintes^{97,98}.

Em valores de pH entre 4 e 6, quatro formas estruturais de antocianina coexistem: cátion flavílico, base quinoidal anidra, carbinol e chalcona.



Esquema 9. Formas estruturais da antocianina dependendo do pH e reação de degradação. Cátion flavílico (A), espécies quinoidais (B-D), pseudobase carbinol (E) e chalcona (F). Adaptado de⁹⁸.

A estabilidade das antocianidinas é influenciada pelos substituintes do anel benzênico, radicais R e R', por grupos metóxi ou hidróxi, os quais diminuem a estabilidade da aglicona, sendo a pelargonidina a antocianidina mais estável^{97,98}.

Naturalmente, a coloração das antocianinas é diretamente influenciada pela substituição dos grupos hidroxila e metoxila na molécula. Incrementos no número de grupos hidroxila tendem a tornar a coloração azulada. Na direção contrária, incrementos no número de grupos metoxilas aumentam a intensidade do vermelho¹⁰¹.

Os pigmentos acilados são mais estáveis do que seus análogos não acilados⁹⁷. Com todos estes fatos em mente, não surpreende a gama de colorações

observadas na natureza que é produzida a partir da estrutura básica das antocianinas⁹⁸.

A estabilidade das antocianinas é maior sob condições ácidas, mas pode ocorrer degradação por vários mecanismos, iniciando com perda da cor, seguida do surgimento de coloração amarelada e formação de produtos insolúveis⁹⁷.

O efeito destruidor da luz se faz sentir nas antocianinas com considerável intensidade e este efeito está estreitamente ligado ao efeito do pH. Para valores de pH 3,0 a 3,8 observa-se baixa sensibilidade à fotodegradação¹⁰².

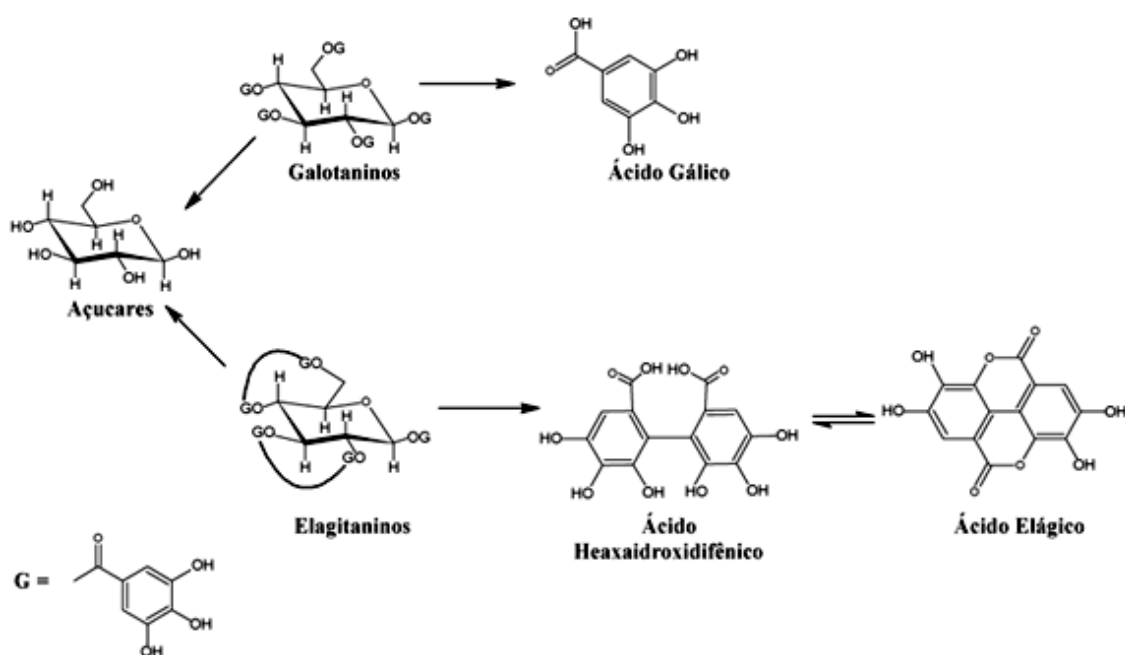
A temperatura é outro fator importante na estabilidade das antocianinas porque à medida que se submete a solução de antocianinas a uma temperatura superior a ambiente (25°C), a sua degradação é maior, e esta degradação é ainda mais acentuada quando se aumenta o pH do meio⁹⁷.

2.3.5 Tanino

O termo tanino foi o nome dado à infusão de cascas de árvores como o carvalho e a castanheira, na qual as peles de animais eram tratadas para obtenção de couros maleáveis e de grande durabilidade. Os taninos foram inicialmente identificados pelo seu sabor adstringente e pela sua capacidade de precipitar proteínas solúveis. Eles são encontrados em muitas plantas usadas pelo homem na forma de ervas medicinais, na alimentação e na fabricação de bebidas. Nas plantas, os taninos podem ser encontrados em raízes, flores, frutos, folhas, cascas e na madeira. Eles contribuem para o sabor adstringente em comidas e bebidas, como aquele sentido ao se consumir vinhos tintos, chás e frutas verdes. Alguns pesquisadores provaram que os taninos servem para proteger as plantas contra os herbívoros e as doenças patogênicas^{103,104}.

Taninos são metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas¹⁰⁵. Eles foram classificados em dois grupos: as proantocianidinas, que são os taninos condensados, responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência, precipitação de proteínas etc., e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glicose¹⁰⁶.

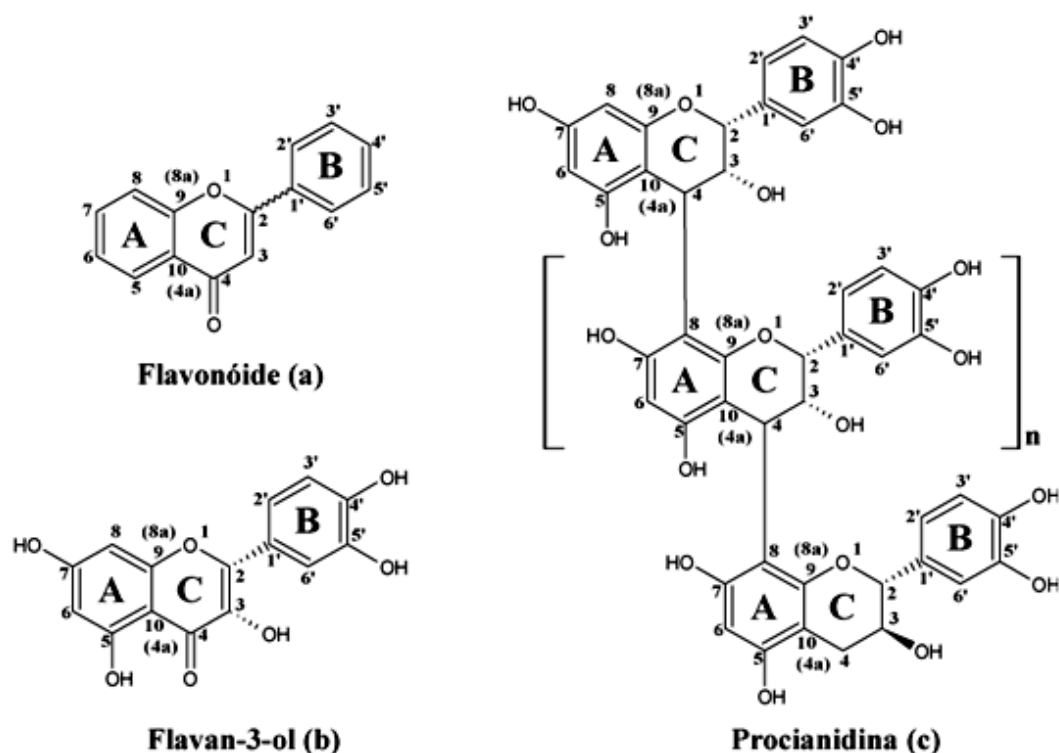
Normalmente, os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos, que produzem ácido gálico após hidrólise, e em elagitaninos, que produzem ácido elágico após hidrólise ¹⁰⁷. Estes taninos não são muito comuns em madeiras, quando comparados aos taninos condensados. No Esquema 10 estão apresentados exemplos de galotaninos e elagitaninos.



Esquema 10. Taninos hidrolisáveis. Adaptado de ¹⁰⁶.

Os taninos condensados (ou proantocianidinas) perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores. Eles são polímeros não ramificados de unidades de flavonoides (flavan-3-ol) ou por um derivado deste e geralmente têm massa molecular maior que os taninos hidrolisáveis (1000-20000 Da comparado com 500-3000 Da) ^{108,109}.

As ligações entre as unidades de flavonoides ocorre normalmente entre os carbonos 4 de uma estrutura e 8 da outra. Variações podem ocorrer por diferentes números de monômeros ligados, pela posição de ocorrência das ligações, pelo padrão de oxigenação nos anéis **A** e **B** da unidade flavan-3-ol e pela estereoquímica dos substituintes do anel **C**. No Esquema 11, ilustra-se a estrutura de um tanino condensado muito comum, a procianidina.



Esquema 11. Fórmulas estruturais: a) um flavonóide genérico, b) flavan-3-ol e c) procianidina (tanino condensado). Adaptado de ¹⁰⁶.

Os taninos condensados são compostos complexos não hidrolisáveis constituídos por grupos flavonóides. São constituídos principalmente de cianidina e delphinidina que são responsáveis pelo gosto adstringente de frutas e vinhos.

Estudos relatam propriedades antibacterianas dos taninos. O tanino extraído da acácia negra (*Acacia mearnsii*) tem sido relatado como sendo bacteriostático ou bactericida contra bactéria *Staphylococcus aureus* ¹¹⁰. Taninos hidrolisáveis, particularmente, ácido tânico e tanino de mimosa inibem significativamente o crescimento de *Staphylococcus aureus* na superfície e polpa da madeira e também mostram algum efeito antibacteriano contra *Escherichia coli* ¹¹¹.

Ao nosso conhecimento, o encapsulamento de produtos naturais em sílica, com vistas à aplicação na adição de conservação de alimentos não foi ainda investigado.

Uma das principais vantagens do encapsulamento com sílica é o fato de ser um processo que pode ocorrer à temperatura ambiente passível para biomoléculas resistirem, ou seja, com baixo risco de degradação. Entretanto, os sítios ativos das

biomoléculas são facilmente acessados pelos poros da matriz de sílica mantendo a atividade ¹¹². Portanto, o método sol-gel de síntese torna-se uma boa alternativa para busca de maior estabilidade (térmica, à luz e etc.) de compostos lábeis como os obtidos de fonte natural: extratos, óleos essenciais, pigmentos entre outros.

2.4 PROCESSO SOL-GEL DE SÍNTESE

A polimerização sol-gel de tetraalcoxissilanos, como Si(OEt)₄ (TEOS) ou Si(OMe)₄ (TMOS), é um método simples e útil para obtenção de sílicas géis amorfas. Segundo IUPAC, o termo sol-gel refere-se ao processo do qual uma rede é formada a partir de uma solução pela transição progressiva de um precursor líquido para um sol, para um gel, e na maioria dos casos finalmente para uma rede seca. Um polímero inorgânico (exemplo sílica gel), ou um híbrido orgânico-inorgânico pode ser preparado pelo processo sol-gel ¹¹³.

Para o método sol-gel, as principais reações que resultam na gelificação são: (1) hidrólise e (2) condensação, que estão representadas nas Equações 9 e 10, para precursores do tipo alcóxido. As reações de hidrólise geram grupos Si-OH a partir de grupos Si-OR, seguido da reação de condensação que pode ocorrer via mecanismo com formação de álcool ou água ¹¹⁴.

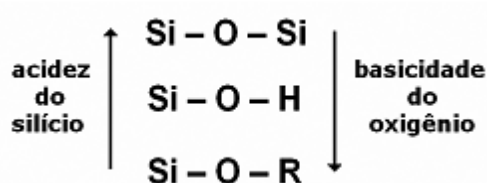


Numa etapa posterior, o gel é processado pela secagem seja pelo aumento de temperatura ou diminuição de pressão. Durante esse tempo, o volume do gel é reduzido em torno de 80 % resultando em um xerogel ¹¹⁵. Os xerogéis em pó são usualmente obtidos quando o gel úmido é seco convencionalmente. Entretanto, aerogéis são obtidos quando o líquido do poro do gel úmido é substituído por ar, sem alterar a estrutura da rede ou o volume do gel obtido ¹¹⁴. Os produtos gerados caracterizam-se por área específica elevada.

Sendo as reações de gelificação de alcóxidos de silício bastante lentas, comumente são adicionados catalisadores que geralmente são classificados em dois tipos: ácidos e básicos. Para entender a diferença é necessário lembrar que o ponto de carga zero (PCZ)¹ de espécies contendo Si-OH está entre pH 1,5 e 4,5 sendo que o maior grau de condensação das espécies de sílica ocorre abaixo do PCZ. Acidificando a solução para pH abaixo do PCZ, as espécies contendo silício ficarão carregadas positivamente, enquanto que acima do pH de PCZ (meio básico), as espécies estarão carregadas negativamente ¹¹⁴.

Na gelificação em meio ácido ocorre o ataque do ácido ao oxigênio ligado ao silício, Si – OH ou Si – OR, causando a sua protonação e propiciando sua saída e, conseqüentemente, facilitando o ataque nucleofílico ao silício, por moléculas de H₂O no caso de hidrólise ou Si – OH para condensação ¹¹⁴.

Considerando que as variações de basicidade do oxigênio e de acidez do silício seguem a ordem representada no Esquema 12, o ataque ácido se dará preferencialmente ao oxigênio do alcóxido, que é mais abundante nas extremidades dos oligômeros. Portanto, a gelificação em meio ácido resultará em cadeias que se unem para formar géis poliméricos que, após a secagem, dão origem a uma matriz compacta com baixo volume de poros e cujo tamanho é, geralmente, menor que 2 nm de diâmetro, chamados microporos ¹¹⁰.



Esquema 12. Variação de acidez do silício e basicidade do oxigênio. Adaptado de ¹¹⁶.

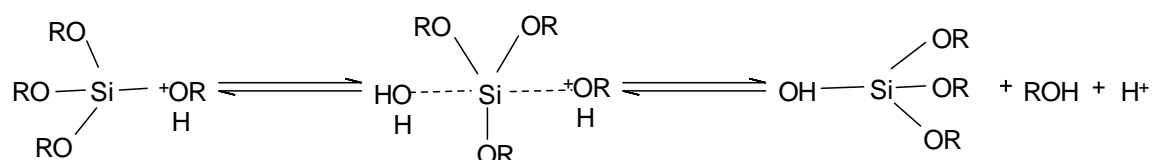
Entretanto, se a reação de gelificação for realizada em meio básico, que se caracteriza inicialmente pelo ataque nucleofílico ao Si, pelo ânion hidroxila (HO⁻) para hidrólise ou pelo ânion Si-O⁻) no caso de condensação, o ataque dar-se-á no Si

¹ Ponto de carga zero (PCZ) ou ponto isoelétrico: valor de pH no qual a carga elétrica de uma entidade elementar é zero. (IUPAC – Disponível eletronicamente em <<http://goldbook.iupac.org.br/I03275.html>> Acesso em 11 jan. 2015.

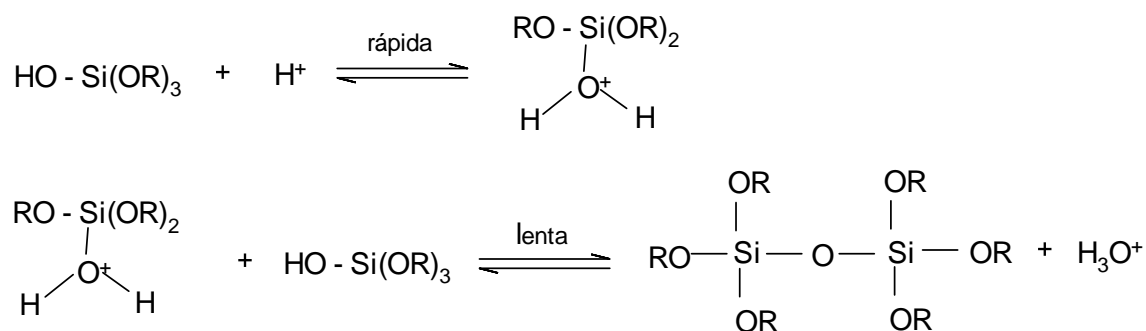
mais ácido que é o mais reticulado. Nesse caso, o gel tende a crescer de forma mais reticulada, formando partículas primárias esféricas. O gel resultante da interconexão das partículas primárias é chamado de gel coloidal que, após a secagem, resultará em matriz com maior porosidade que o gel polimérico, com largas frações de poros entre 2 e 50 nm de diâmetro, chamados mesoporos ^{114,117}.

No caso da polimerização sol-gel de TEOS, a hidrólise ocorre quando TEOS e água são misturados simultaneamente em um solvente. Os intermediários que são produzidos incluem grupos (Si-OH), chamados de silanóis. Ao invés da condensação, pode ocorrer entre dois silanóis ou um silanol e um grupo etóxi para formar uma ponte de oxigênio ou grupo siloxano Si-O-Si. No Esquema 13 observa-se a eliminação de etanol ou água através do mecanismo da reação ¹¹⁵.

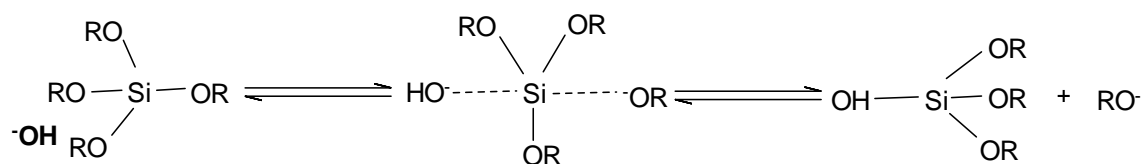
Hidrólise catalisada por ácido



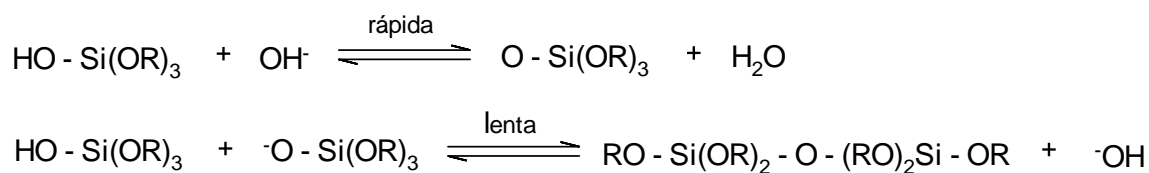
Condensação catalisada por ácido



Hidrólise catalisada por base

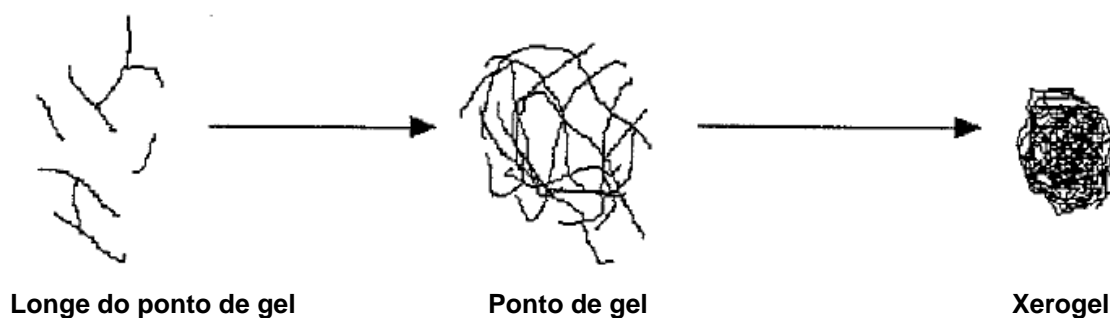


Condensação catalisada por base



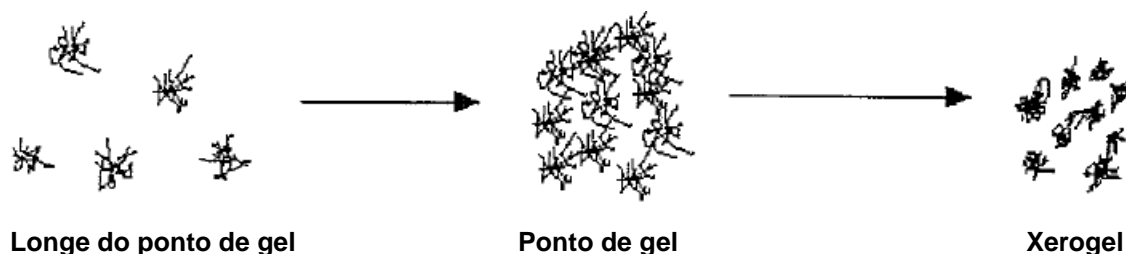
Esquema 13. Mecanismo para hidrólise e condensação de alcóxissilanos. Adaptado de ¹¹⁵.

Em condições ácidas, a sílica tende a formar moléculas lineares que ocasionalmente reticulam, conforme Esquema 14.



Esquema 14. Hidrólise catalisada por ácido. Adaptado de ¹¹⁵.

Porém, em condições básicas (hidrólise básica) formam-se *clusters* mais ramificados que não são interpenetráveis após a secagem e, então, comportam-se como espécies distintas (Esquema 15).



Esquema 15. Hidrólise catalisada por base. Adaptado de ¹¹⁵.

O processo sol-gel é relativamente simples pelo número de etapas, mas complexo, pelo envolvimento de diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, etc. Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação, homogeneidade do produto, etc.

Em suma, o uso de indicadores naturais é uma demanda de mercado. No entanto, a degradabilidade frente à variação de condições ambientais (temperatura,

pH, exposição à luz entre outras) exige a busca por alternativas que confirmem estabilidade a esses sistemas, permitindo seu processamento na confecção de embalagens. Nessa direção, o encapsulamento em matrizes de sílica, via processo sol-gel, apresenta-se como uma alternativa potencial no desenvolvimento desses dispositivos a serem aplicados em embalagens inteligentes e ativas. Dessa forma, o desenvolvimento do presente trabalho buscou responder alguns questionamentos: o encapsulamento de extratos naturais por processo sol-gel garantiria sua atividades, conferindo estabilidade a esses materiais? A rota de encapsulamento afetaria a performance desses materiais? O encapsulamento conferiria propriedades adicionais em termos de atividade antimicrobiana?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a viabilidade de encapsulamento de extratos naturais obtidos de plantas em matrizes de sílica pelo processo sol-gel para potencial aplicação na conservação de alimentos tanto em embalagens ativas e inteligentes.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antimicrobiano dos extratos naturais: urucum, curcumina, folha de oliva, tanino e antocianinas;
- Avaliar o efeito da rota sol-gel nas características estruturais, morfológicas e texturais dos xerogeís híbridos obtidos;
- Correlacionar a rota de encapsulamento com a atividade antioxidante e antimicrobiana dos materiais;
- Desenvolver uma etiqueta (ou filme) indicadora de frescor a base biopolímero quitosana/PVA e antocianinas para monitoramento de deterioração de pescado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- Tetraetiletoxissilano (TEOS) (ACROS, 98% de pureza);
- Extrato de antocianinas (amostra cedida gentilmente pela Chr Hansen Ind. e Com. Ltda.);
- Extrato de oliva hidroalcolico (50% p/v);
- Extrato de urucum comercial;
- Extrato de cúrcuma comercial;
- Tanino (amostra cedida gentilmente pela TANAC SA);
- Água deionizada;
- Solução de HCl 0,2 M e 0,1 M
- Solução de NaOH 0,2 M
- Solução de quitosana acetilada em meio ácido (50% p/v);
- Álcool polivinílico (PVA) (Impex, 79,5% de pureza);
- Solução de tripolifosfato de sódio (0,1% p/v);
- Filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) (Resina PS150, Braskem);
- Filé de peixe tilápia (*Tilapia rendali*) oriundo do criadouro pertencente ao Instituto Federal – Concórdia. As amostras foram preparadas após *rigor mortis* (4h) sob condições higiênicas de manipulação.

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Encapsulamento do composto bioativo via método sol-gel

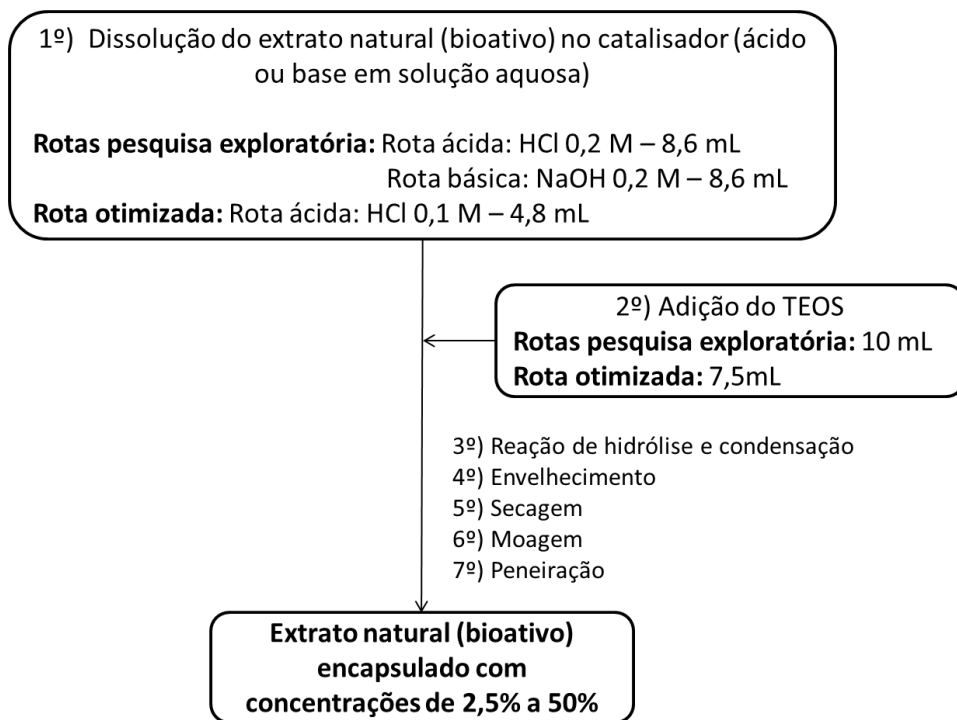
O encapsulamento dos extratos naturais ou bioativos foi preparado pelo método sol-gel usando como precursor o tetraetiletoxissilano. Dentre as rotas

catalíticas estudadas em pesquisa exploratória (ácida e básica) utilizou-se na rota ácida como catalisador solução de HCl 0,2M e na rota básica solução de NaOH 0,2M com uma relação molar (1:12:0,04) de TEOS:água:catalisador e na rota ácida otimizada para o extrato contendo antocianinas solução de HCl 0,1M com uma relação molar (1:10:0,05) de TEOS:água:catalisador como mostra o Esquema 16.

As etapas envolvidas nesse processo incluem a co-hidrólise e a condensação dos compostos TEOS e organossilano na presença de um catalisador (um ácido ou uma base), dando origem a um sistema *sol* que, posteriormente, formará um sistema *gel*. Após secagem é obtido o extrato natural encapsulado numa matriz de sílica contendo a funcionalidade do organossilano empregado.

Primeiramente foi dissolvido o extrato natural em solução de HCl ou NaOH até total dissolução seguido da adição de TEOS. A reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação constante apresentando tempo de gelificação de aproximadamente 24 h. Após realizada a secagem em estufa em temperatura máxima de 50°C, foi realizada a moagem em gral de porcelana até obtenção de um pó fino e homogêneo com posterior passagem em peneira de 53 mm/μm.

Os parâmetros reacionais (concentração de bioativo, TEOS e solução HCl ou NaOH e tempo de adição do bioativo) foram determinados com base na otimização do tempo de gelificação e efetividade na aplicação proposta por esse estudo fundamentada pela avaliação da morfologia, estrutura e composição química dos produtos resultantes.



Esquema 16. Esquema geral de encapsulamento via processo sol-gel

As amostras dos materiais encapsulados em sílica, via rota sol-gel, receberam identificação seguindo a seguinte codificação: três primeiras letras do nome do extrato natural seguido do seu valor em concentração (% em massa) e das letras A (rota ácida) ou B (rota básica), conforme ilustrado na Tabela V.

Tabela V. Código para as amostras preparadas via rota sol-gel com diferentes extratos naturais e antibióticos utilizados como referência

Código	Descrição
A	Rota ácida
B	Rota básica
Controle	Sem adição de extrato natural (sílica)
ANT	Extrato de antocianina
TAN	Tanino
OLI	Extrato de folha de oliva
URU	Extrato de urucum
CUR	Extrato de cúrcuma
GEN	Gentamicina (antibiótico referência)
AMP	Ampicilina (antibiótico referência)

*Ex.: ANT20A – Encapsulado com extrato de antocianina a 20% obtido via rota ácida

4.2.2 Preparação do filme ativo e indicador

A fabricação da etiqueta ativa e inteligente foi realizada em três etapas. A primeira etapa consistiu na mistura da antocianina encapsulada obtida pela síntese via processo sol-gel (vide Preparação das amostras pelo método sol-gel). A segunda etapa foi a preparação de um biopolímero contendo mistura de solução de quitosana 50% e álcool polivinílico (PVA) 79,5% numa proporção de (24:56 %v/v) respectivamente, com adição de 1,5mL de solução de tripolifosfato de sódio 0,1%p/v como agente reticulante sob constante agitação.

Após adiciona-se 1,5 g de antocianina encapsulada para sua incorporação ao hidrogel sob mais 1 hora de agitação. Uma etiqueta sem aditivo foi desenvolvida como amostra controle (C) e uma etiqueta com antocianina pura. Finalmente, na terceira etapa, foi realizada a difusão de 40 mL do biopolímero ainda em fase hidrogel sobre placa de Petri (100 mm de diâmetro) e após procedeu-se secagem

em estufa a 40 °C por 48 horas para remoção do solvente lentamente resultando no filme ativo e indicador.

O filme controle foi preparado como descrito acima, porém sem adição do extrato de antocianina.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS E DO FILME ATIVO E INDICADOR

Entre as técnicas espectroscópicas e microscópicas utilizadas para caracterização dos materiais encapsulados foram empregadas: espectroscopia molecular no infravermelho - FTIR (grupos orgânicos dos extratos naturais), espectroscopia molecular no ultravioleta e visível (quantificação do extrato no Ensaio de lixiviação e material encapsulado), microscopia eletrônica de varredura - SEM (morfologia), porosimetria de nitrogênio (área específica e volume de poros), e espalhamento de raios X a baixo ângulo - SAXS (estrutura fractal). A estabilidade térmica dos materiais foi medida por análise termogravimétrica - TGA.

A caracterização do filme ativo e indicador foi baseada nas características estruturais via espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível por refletância difusa (DRS), propriedades térmicas por análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) e propriedades mecânicas.

4.3.1 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} das amostras foram obtidos no espectrofotômetro com transformada de Fourier Shimadzu, modelo 8300. Foram utilizados pastilha em KBr para amostras sólidas. Os espectros foram coletados com 30 varreduras e 4 cm^{-1} de resolução. A análise dos espectros na região do infravermelho é uma importante técnica de

caracterização, pois fornece uma avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais próprios da sílica e na identificação de grupos funcionais característicos dos bioativos encapsulados.

4.3.2 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível (UV-vis)

Os espectros de absorção (UV-vis) foram obtidos no espectrômetro Varian Cary 100 ultravioleta-visível com cubeta de quartzo de 1 cm de comprimento óptico e realização de leituras na faixa de comprimento de onda de 200 - 600 nm para o monitoramento das alíquotas de soluções aquosas obtidas no ensaio de lixiviação do bioativo encapsulado (vide Ensaio de lixiviação).

4.3.3 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível por Refletância Difusa (DRS)

As análises foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-Vis acoplado a um acessório para operação em modo refletância difusa (DRS) Carry 100 da Varian. As varreduras foram realizadas na faixa de 200 a 800 nm. Para as análises foi utilizado um porta-amostra de plástico discoidal (3 cm de diâmetro) composto por um anel de borracha de 2 cm de diâmetro (delimitador de quantidade de material empregado na medida) e uma janela de quartzo.

Para a análise do filme ativo e indicador e do filme controle foi colocado um recorte do biopolímero diretamente no suporte do acessório, ou seja, em contato direto com o feixe.

4.3.3.1 Análise semi-quantitativa do teor de antocianinas nas amostras de material encapsulado em sílica

A quantificação do teor de antocianinas nas amostras foi realizada baseada na curva de calibração (Figura 1), construída com quatro padrões de concentração conhecidos obtidos pelo mesmo processo das amostras, de acordo com a Equação (3):

$$A=0,0126.C + 0,5179 \quad (3)$$

Em que: A = Absorbância e C = concentração em %

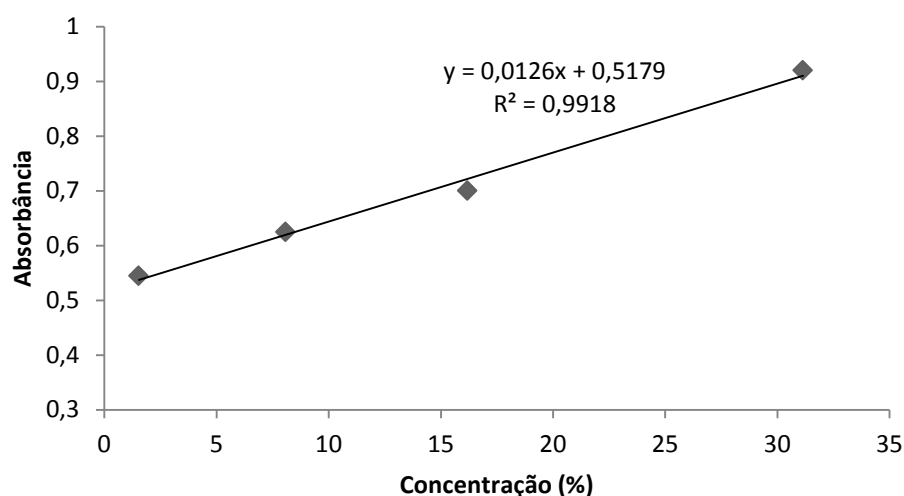


Figura 1. Curva de calibração para encapsulados com antocianina

4.3.4 Espectrometria de Massa por Inserção Direta

Análise realizada em equipamento GC-MS – Shimadzu modelo QP2010S por inserção direta da amostra na unidade de massa para sólidos termolábeis. Cerca de 20 µg de amostra diluída em 1 mL de etanol foi inserida diretamente na fonte de íons, através de uma sonda, sem passar pela coluna do CG. Esta técnica é usada para compostos termicamente degradáveis ou de difícil vaporização. O equipamento não necessita nenhuma adaptação e a velocidade de varredura foi de 20000 u/s a 100 Hz e as amostras sofreram ionização química positiva e negativa por impacto eletrônico. Esta análise direta e rápida foi aplicada para investigação dos fragmentos dos extratos naturais em estudo e respectivos encapsulados em sílica. A faixa de

identificação massa/carga neste tipo de equipamento varia de 1,5 a 1200 Da. As análises foram realizadas tomando como referência os valores obtidos dos espectros dos extratos puros antes do processamento e dados obtidos da literatura.

4.3.5 Método de BET de adsorção/dessorção de nitrogênio

A caracterização textural porosimétrica dos bioativos encapsulados foi realizada através do método de BET de adsorção/dessorção de nitrogênio desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller, em um analisador Flowsorb II 300 da Micromeritics. Inicialmente, todas as superfícies de uma massa de amostra de aproximadamente 200 mg foram dessecadas a 100°C. Nessas medidas, um volume de gás nitrogênio é adsorvido a diversas pressões, recobrando inteiramente a superfície do sólido a -196°C.

4.3.6 Espalhamento de Raio X de baixo Ângulo (SAXS)

Os dados de SAXS foram coletados no laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS; Campinas, BR utilizando um detector de área MAR CCD 165 (MAR Research) e 120 segundos de exposição para cada medição. Através desses dados determinou-se a média do raio de giro e raio das partículas. Amostras do controle e bioativo encapsulado em matriz de sílica foram colocados perpendicularmente ao feixe de raios X em uma célula de inox previamente selada de 1 mm de espessura, usando comprimento de onda de 1,488 nm e uma distância do detector – amostra de 448 e 2950 mm.

O feixe de raios X foi monocromatizado, o que significa de um monocromador de silício e toda as medidas foram realizadas em temperatura ambiente. Behenato de prata foi usado como padrão para calibração da distância amostra – detector, inclinação e posição do feixe direto. A análise dos dados foi realizada pelo IRENA aplicado para o software Igor Pro 8.5 (WaveMetrics, Portland, USA).

4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

O tamanho e a forma das partículas de bioativo encapsulado foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura num microscópio eletrônico de varredura de JEOL, modelo JSM 6060, operando em 10 kv. Cada amostra foi preparada colocando-se uma quantidade mínima suficiente para cobrir a fita de carbono fixada no suporte de alumínio (stub) formando uma fina camada e após metalização pela aplicação de uma fina camada de ouro.

4.3.8 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLM)

As análises foram realizadas em um microscópio confocal de varredura a laser Olympus, modelo Fluoview FV1000, equipado com quatro lasers de diodo, com comprimentos de onda iguais a 405 nm, 473 nm, 559 nm e 635 nm. A partir de uma varredura espectral, a intensidade máxima de fluorescência, para o extrato de antocianinas utilizado foi determinado no intervalo entre 585 – 605 nm, o qual foi considerado para a aquisição de imagens. As amostras dos encapsulados foram depositadas sobre uma lâmina de vidro (76 x 20 x 1 mm), embebidas em Nujol, e, então cobertas por uma lamínula de vidro. A lamínula foi fixada à lâmina pela utilização de esmalte transparente.

4.3.9 Análise termogravimétrica (TGA)

A perda de massa durante a degradação térmica e a composição química do bioativo encapsulado e do bioativo puro foi determinada por análise de TGA, usando painéis de alumínio sob as seguintes condições: amostra – aproximadamente 10

mg; atmosfera: nitrogênio (fluxo 50 mL/min.); velocidade: 20°C/min; e faixa de temperatura para análise: 40°C to 600°C.

Na análise dos filmes também foram utilizadas panelinhas de alumínio como porta amostras sob as seguintes condições: amostra – aproximadamente 10 mg; atmosfera: nitrogênio (fluxo 50 mL/min.); velocidade de aquecimento: 10°C/min; e faixa de temperatura para análise: 40°C a 1000°C. Os experimentos foram conduzidos em um aparelho TGA (Shimadzu TGA- 50, Japan).

4.3.10 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas usando panelinhas de alumínio Stander sob as seguintes condições: filme – aproximadamente 3 mg; atmosfera: nitrogênio (fluxo 50 mL/min.); velocidade 10°C/min; e faixa de temperatura para análise: -20 a 395°C. Os experimentos foram conduzidos em um aparelho DSC Q20 (TA Instruments, USA).

4.4 AVALIAÇÃO DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS

Os materiais encapsulados foram avaliados quanto à capacidade de lixiviação. Essa medida serviu para avaliar a potencial atividade inibitória contra determinados microorganismos patógenos.

4.4.1 Ensaio de lixiviação

Primeiramente foi realizada lavagem do material encapsulado com extrato de antocianina com alíquotas de água consecutivas e suficientes até alcançar ausência de sinal na leitura das alíquotas em espectrofotômetro na região do ultravioleta e visível. Após, o material foi seco em estufa e então realizado o ensaio de lixiviação a partir de 100 mL de uma solução aquosa de 200 mg/L do mesmo com coleta de alíquotas de 5 mL no tempo zero (inicial), após 30 min, 1 h, 1h30 min, 2 h, 3 h e 5 h.

A determinação quantitativa do extrato nas alíquotas obtidas no ensaio de lixiviação foi realizada baseada na curva de calibração (Figura 2), construída com cinco padrões de concentração conhecidos de acordo com a Equação (4):

$$A=0,004.C - 0,018 \quad (4)$$

Em que: A = Absorbância e C = concentração em mg.L⁻¹.

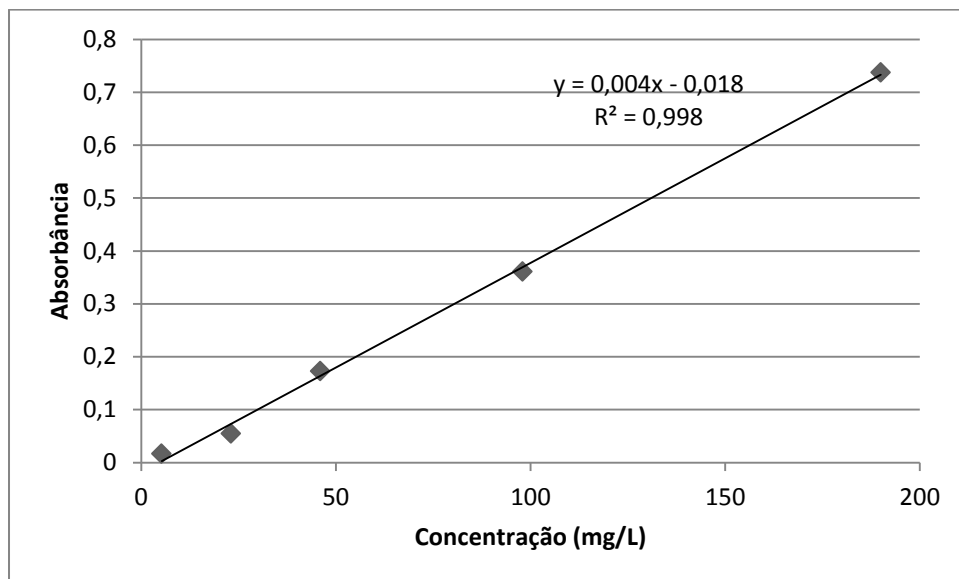


Figura 2. Curva de calibração para antocianina em solução aquosa

4.4.2 Avaliação antimicrobiana dos materiais encapsulados

4.4.2.1 Preparação dos inóculos

Foram preparados inóculos de espécies de microrganismos relevantes para o controle em indústria de alimentos: *Staphylococcus aureus* ATCC H757, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC H254, *Candida sp* ATCC 4022-7 e *Aspergillus niger*, todos oriundos da coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz. As cepas dos microrganismos a serem testados foram mantidas a -20°C e repicadas em ágar sangue e incubadas a 35°C por 24h a fim de verificar-se a morfologia das colônias e a pureza da cultura.

O inóculo consistiu de uma cultura *overnight* de cada espécie bacteriana em caldo Müller-Hinton, diluída no mesmo meio de cultura a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5.

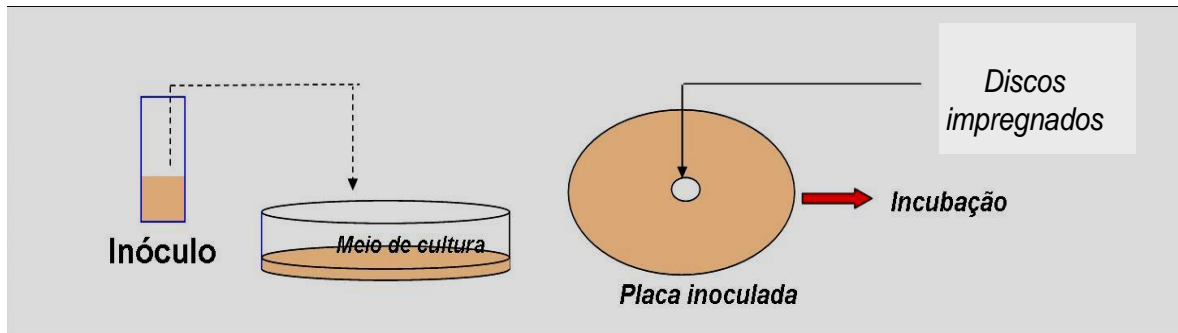
4.4.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada pelo método de difusão em ágar Miller Hinton conforme descrito na metodologia NCCLS (2003) ¹¹⁸.

Um volume absorvido da solução salina padronizada contendo o microrganismo de interesse foi semeada por estiramento com *swab* estéril no sentido transversal e longitudinal nas placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton para crescimento. O ágar foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 30 min antes de ser vertido e solidificado nas placas.

Em seguida, um disco de papel filtro estéril (1200 *Mesh*) de aproximadamente 5mm de diâmetro previamente impregnado com 25 μ L de uma solução 25 ppm do

agente antimicrobiano a ser testado foi fixado na superfície do meio para posterior inoculação e possível migração do mesmo, conforme ilustrado no Esquema 17.



Esquema 17. Procedimento para determinação da atividade antimicrobiana

As soluções para teste foram preparadas através da diluição em água destilada e esterilizada para uma concentração de 25 ppm conforme as normas *NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2003). O volume de adsorção da solução nos disco foi de 25 μL . A avaliação do potencial antimicrobiano expresso pelos compostos definidos foi realizada em triplicata de ensaio.

Para efeito de comparação em relação ao tamanho do *halo* de inibição, foi também testado o efeito de antibióticos impregnados em discos comerciais: ampicilina (10 $\mu\text{g}/\text{disco}$), gentamicina (25 $\mu\text{g}/\text{disco}$) e cloranfenicol (30 $\mu\text{g}/\text{disco}$) foram utilizados como controles positivos.

Os resultados obtidos do potencial antimicrobiano de cada composto foram expressos como média de quatro medições radiais resultantes da soma do diâmetro do disco e do *halo* de inibição ($\text{mm} \pm \text{SD}$).

4.4.3 Contagem microbiana de pescado embalada

A carne de peixe acondicionadas nos filmes foi avaliada quanto à Contagem Bacteriana Total (CTB) (APHA, 2001) durante 5 dias de estocagem sob refrigeração na temperatura de 6 a 8°C. Amostras de carne contendo ($25 \pm 0,2$ g) foram diariamente retiradas de cada embalagem e adicionadas de 225 mL de água peptonada 0,1%, e então homogeneizadas em *stomacher*. A CBT foi realizada em ágar PCA (*Plate Count Agar*), com inoculação em profundidade, após incubação a 36°C por 48h. O procedimento foi realizado em duplicata.

4.4.4 pH

A análise de pH foi realizada usando pHmetro digital (Digimed, DM-21) com eletrodo de vidro previamente calibrado com soluções padrão pH 4, pH 7 e pH 10 que foi inserido numa porção do filé de peixe previamente macerado em gral em triplicata durante os 4 dias de monitoramento.

4.4.5 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato de antocianina bem como seus encapsulados foi determinada através da atividade de sequestro do radical 2,2-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina -6-sulfônico) (ABTS). Os experimentos foram realizados usando método ABTS ¹¹⁹ que envolve a geração de radical cromóforo ABTS pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio. O cátion do radical ABTS foi produzido pela reação de solução estoque de ABTS 7 mmol.L^{-1} com persulfato de potássio 140 mmol.L^{-1} (concentração final) deixando a mistura descansar no escuro por no mínimo 12 h em temperatura ambiente antes do uso. Para o ensaio, o radical ABTS• mais a solução foram diluídos com solução salina de tampão fosfato pH 7,0 (PBS) para uma absorvância de $0,7 (\pm 0,02)$ em 734 nm lida após 6 min.

As medidas foram realizadas com 0,2 mg, 0,4 mg, 0,6 mg, 0,9 mg e 1,1 mg de extrato de antocianina e 0,2 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg dos encapsulados.

4.5 AVALIAÇÃO DO FILME ATIVO E INDICADOR

O filme ativo e indicador foi avaliado conforme variação dos parâmetros colorimétricos, pH da carne de peixe e contagem pela contagem de microrganismos componentes da microbiota deteriorante durante monitoramento do processo de degradação do filé de peixe Tilápia.

4.5.1 Análise de cor (Colorimétrica)

Os parâmetros colorimétricos do filme indicador foram determinados em colorímetro modelo CR 400 (Konica Minolta). Os valores de L^* (luminosidade), parâmetros a^* (vermelho-verde) e b^* (amarelo – azul) foram utilizados para avaliação das mudanças de coloração do filme em contato com a filé de peixe Tilápia para monitoramento da alteração do pH da carne devido ao processo de degradação natural desse alimento.

Os testes foram realizados em triplicata e avaliou-se a diferença total de coloração (ΔE) de acordo com a Equação (5) e intensidade através do índice Croma (*C) de acordo com a Equação (6):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (5)$$

Em que: $\Delta L = L^* - L_0^*$; $\Delta a = a^* - a_0^*$ e $\Delta b^* = b^* - b_0^*$ e (L_0^* , a_0^* , b_0^* são valores do TTI controle, ou seja, sem antocianina encapsulada)

$$^*C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (6)$$

O filme foi cortado em quadrados de 2 x 2 cm e colocado em contato direto com pedaços de filé de peixe do tipo Tilápia que após foram lacrados em sacos plásticos de filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) sob vácuo e mantidos sob refrigeração de 6 a 8°C. Os filés foram retirados de peixe oriundo do criadouro pertencente ao Instituto Federal – Concórdia e preparados após rigor mortis (4h)

sob condições higiênicas de manipulação. Foi realizado monitoramento diário do filme através da análise colorimétrica, alteração de pH da carne através de pHmetro digital calibrado e contagem de microrganismos componentes da microbiota deteriorante durante 5 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

4.5.2 Medida de espessura e propriedades mecânicas

4.5.2.1 Medida de espessura

A medida de espessura dos filmes foi realizada com um micrômetro milesimal 0-30 mm, marca Tesa e modelo Micromaster (precisão: 0,001 mm). Os resultados foram obtidos da média de cinco pontos de cada filme produzido.

4.5.2.2 Resistência à tração

Os filmes controle e indicador foram cortados em corpos de prova de 36 x 6,25 mm e condicionados à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $50\% \pm 10\%$, por 48 h, de acordo com a norma D618-08 da American Society for Testing Materials (ASTM, 2008).

O equipamento usado para estabelecer os parâmetros foi um Emic DL® modelo 2000. Ele foi equipado com uma célula de carga de 50N (Trd 18) e velocidade de 5 cm/min em temperatura em torno de 20°C sob 50% de umidade relativa.



Figura 3. Foto ensaio de resistência à tração (corpo de prova do filme controle).

O ensaio de resistência à tração (Figura 3) foi realizado em triplicata na posição axial baseado na norma ASTM D882-09 da American Society for Testing Materials (ASTM, 2009) em que foi avaliada a força máxima componente (em Newtons - N) versus deformação (mm) para determinação das propriedades mecânicas dos filmes produzidos (filme controle e filme indicador). A força máxima é medida diretamente pelo instrumento e a resistência à tração ou tensão de ruptura (N/mm^2 ou MPa) e a deformação na ruptura (%) são determinadas pelas Equações 7 e 8, respectivamente:

$$\mathbf{RT} = \mathbf{FR} / (\mathbf{LCP} \times \mathbf{ECP}) \quad (7)$$

$$\mathbf{DR} = (\mathbf{ET} / \mathbf{DG}) \times 100 \quad (8)$$

Onde:

RT – Resistência à tração (N/mm^2 ou MPa)

DR – Deformação na ruptura (%)

FR – Força de ruptura (N)

ET - Elongação total antes da ruptura do filme (mm)

DG - Distância inicial entre as garras (mm)

LCP – Largura do corpo de prova (mm)

ECP - Espessura mediana do corpo de prova (mm)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentro do escopo de investigação da presente dissertação foi realizada inicialmente, uma pesquisa exploratória de atividade antimicrobiana de alguns extratos naturais, a saber: extrato de antocianina obtido de casca de uva, oliva, cúrcuma, urucum, tanino e seus, respectivamente, materiais encapsulados em sílica via processo sol-gel que, conforme seus resultados, norteariam a escolha do extrato para investigação da pesquisa. A Tabela VI apresenta os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco. Para fins comparativos, medidas com antibióticos foram também realizadas.

Tabela VI. Atividade antimicrobiana dos extratos puros e dos antibióticos (Cloranfenicol, Gentamicina e Ampicilina) de referência, avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm)^a

Amostra	<i>E. coli</i> (gram-negativa)	<i>S. aureus</i> (gram-positiva)	<i>A. niger</i> (fungo)	<i>Candida sp</i> (levedura)	<i>B. c. aureus</i> (gram-positiva)
Urucum	-	15,7 ± 0,6	-	-	13 ± 1,0
Curcuma	-	-	-	-	-
Tanino	-	21,3 ± 0,6	11,11	10,67 ± 0,68	22,3 ± 0,6
Oliva	-	-	-	-	10,3 ± 0,6
Antocianina	10,56 ± 0,69	-	11,78 ± 0,19	9,33 ± 0,33	-
Cloranfenicol	23,22 ± 3,10	23,22 ± 3,10	-	-	-
Gentamicina	16,56 ± 1,64	17,89 ± 1,54	-	-	-
Ampicilina	20,44 ± 1,71	25,67 ± 2,03	-	-	-

^aZona de inibição (mm) incluindo o diâmetro do disco, de 5mm. Dados referentes à média de três replicatas ± desvio padrão. (-) inibição não detectada.

A intensidade dos halos radiais formados para os extratos naturais avaliados, bem como os antibióticos utilizados como controle, estão ilustrados na Figura 4 para melhor compreensão dos dados numéricos expressos na Tabela VI.

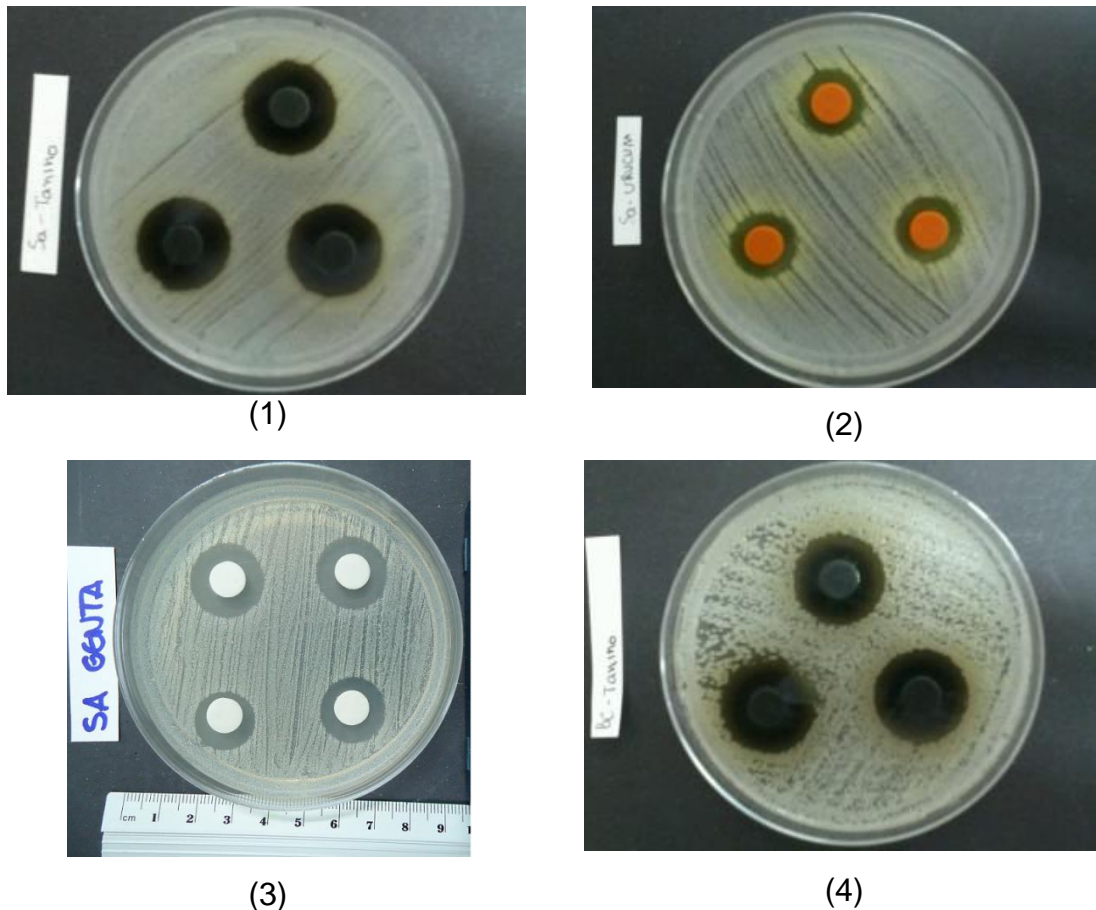


Figura 4. Ensaio de difusão em disco com *Staphylococcus aureus* para tanino (1), urucum, (2) gentamicina (3) e com *Bacillus cereus* para tanino (4).

Dentre os extratos naturais, o tanino e antocianina apresentaram atividade forte, similar àquela obtida para os antibióticos controle para o ensaio de difusão em disco. A cúrcuma não apresentou atividade e o urucum e o extrato de oliva apresentaram atividade fraca e moderada, respectivamente.

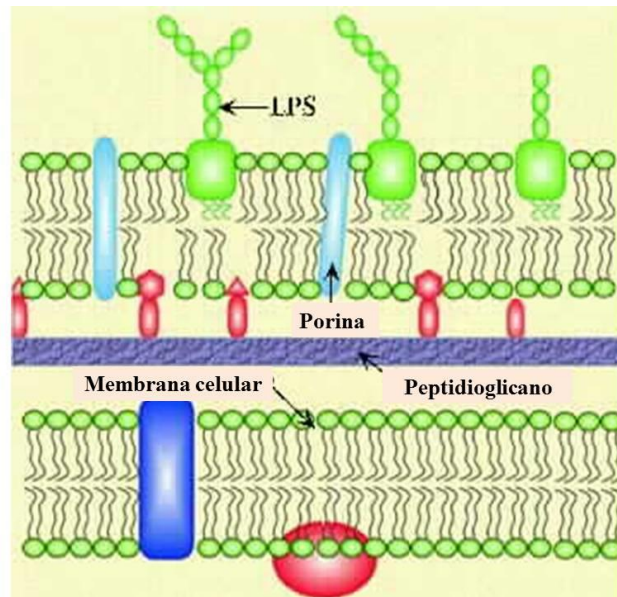
Apesar de no presente ensaio não haver resultados positivos de ação antimicrobiana para cúrcuma, de acordo com a literatura esse extrato natural apresenta atividade antimicrobiana ⁸⁵.

O efeito antimicrobiano de maneira geral foi mais pronunciado para as bactérias gram-positivas do que negativas, pois somente a antocianina apresentou efeito inibitório para *E. coli* (gram-negativa). Isso sugere influência de suas morfologias no mecanismo de ação.

O mecanismo de ação de agentes antibacterianos é de difícil elucidação, mas podem incluir inibição da síntese de parede celular, interrupção da membrana,

inibição da síntese de proteínas ou ácidos nucleicos e interferência com sínteses de folato ¹²⁰.

Nas bactérias gram-negativas (Esquema 18), a parede celular está composta por uma camada de peptidoglicano e um envelope celular formado por lipoproteínas, lipopolissacarídeo (LPS) e fosfolipídeos.



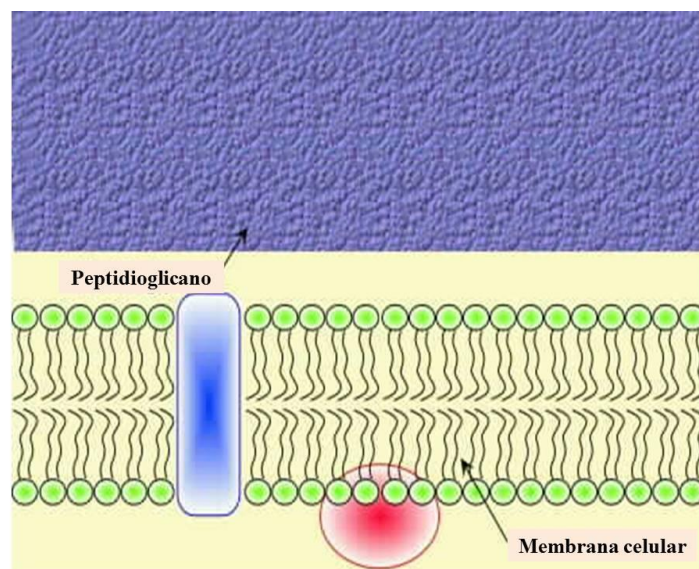
Esquema 18. Membrana bacteriana – Bactéria Gram-negativa. Adaptado de ⁹⁰.

O peptidoglicano, responsável pela proteção do citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e interno, confere rigidez ao corpo bacteriano. O peptidoglicano está localizado entre a membrana citoplasmática (interna) e a membrana externa, onde também são encontradas enzimas hidrolíticas (fosfatases, nucleases, proteases e outras), que facilitam a nutrição bacteriana, proteínas de ligação, que participam da captação de açúcares e aminoácidos a partir do meio, enzimas que inativam certos antibióticos ^{121,122}.

Entre suas funções, a membrana externa representa uma barreira molecular, prevenindo ou dificultando a perda de proteínas periplasmáticas e o acesso de enzimas hidrolíticas e certos antibióticos ao peptidoglicano ^{121, 122}.

Entretanto, a parede celular das bactérias gram-positiva (Esquema 19) e gram-negativa são diferentes. A parede celular da bactéria gram-positiva é espessa, 10 a 50 nm, chegando até a 80 nm e a da gram-negativa é menos espessa (7,5 a 10

nm). A membrana citoplasmática adere fortemente ao componente interno da célula bacteriana. A parede celular da bactéria Gram-positiva é única e consiste de uma camada espessa, composta quase que completamente por peptidoglicano, responsável pela manutenção da célula e sua rigidez. As múltiplas camadas de peptidoglicano (15 a 50 nm) das bactérias Gram-positivas constituem uma estrutura extremamente forte em tensão, enquanto que nas Gram-negativas o peptidoglicano é apenas uma camada espessa e, conseqüentemente, frágil ^{122,123}.



Esquema 19. Membrana bacteriana – Bactéria Gram-positivo. Adaptado de ⁹⁰.

As diferenças estruturais entre esses dois tipos de bactérias podem explicar os resultados do ensaio antimicrobiano visto que a inibição de bactérias do tipo gram-negativa foi mais difícil.

Diante dos resultados expressos na Tabela VI o tanino, o urucum, o extrato de oliva e de antocianina foram escolhidos, como ingredientes ativos, foco de investigação da presente pesquisa, somado ao baixo número de publicações referentes ao uso desses compostos como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes para alimentos, observados durante o levantamento do estado-da-arte. Cabe ainda salientar que o tanino e a antocianina apresentaram o maior espectro de atividade para o grupo de microorganismos avaliados, inibindo também o crescimento de fungo e levedura.

5.1 EXTRATOS ENCAPSULADOS EM SÍLICA

Os extratos de fonte natural selecionados foram encapsulados em sílica, via rota sol-gel e receberam identificação de acordo com a seguinte codificação: três primeiras letras do nome do extrato natural seguido do valor da concentração em % e das letras A (rota ácida) ou B (rota básica), conforme descrito no capítulo Materiais e Métodos.

Os produtos encapsulados foram obtidos na sua maioria via catálise ácida, devido os ensaios preliminares isentos de extratos terem demonstrando que essa rota apresenta rendimentos superiores na ordem de 5 vezes, ou seja, enquanto obtêm-se via rota básica 1 g de material encapsulado, via rota ácida obtêm-se 5 g nas mesmas condições.

Tabela VII. Atividade antimicrobiana dos extratos encapsulados em sílica e dos antibióticos de referência, avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm)^a

Amostra	<i>E. coli</i> (gram-negativa)	<i>S. aureus</i> (gram-positiva)	<i>A. niger</i> (fungo)	<i>Candida sp</i> (levedura)	<i>B. c. aureus</i> (gram-positiva)
OLI2.5A	-	-	-	-	-
OLI2.5B	-	-	-	-	-
URU25A	-	-	-	-	-
TAN25A	-	-	-	-	-
TAN25B	-	21,7 ± 0,6	-	-	21,0 ± 0,1
ANT10A	-	9,8 ± 0,3	5,1 ± 0,2	-	-
ANT25A	-	9,3 ± 0,5	NR	NR	NR
ANT35A	-	-	-	-	-
ANT25B	-	-	NR	NR	NR
ANT50B	-	-	-	-	-
Controle A (sílica)	-	-	-	-	-
Controle B (sílica)	-	-	-	-	-
GEN20A	24,6 ± 0,9	11,2 ± 0,8	NR	NR	NR
AMP20A	19,4 ± 1,1	-	NR	NR	NR

^aZona de inibição (mm) incluindo o diâmetro do disco, de 5mm. Dados referentes à média de três replicatas ± desvio padrão. (-) inibição não detectada.
NR – Não realizado

Dentre os materiais encapsulados destacam-se os contendo tanino e antocianina quanto à ação antimicrobiana. O material encapsulado obtido via rota básica contendo tanino apresentou atividade inibitória para as duas espécies gram-positivas testadas: (*Bacillus cereus aureus* e *Staphylococcus aureus*) ao contrário do obtido via rota ácida que não apresentou atividade.

Os materiais encapsulados obtidos via rota ácida contendo antocianina apresentaram atividade inibitória para espécie gram-positiva *Staphylococcus aureus* e para fungo *Aspergillus niger* enquanto os materiais obtidos via rota básica não apresentaram atividade. Já os materiais encapsulados contendo extrato de oliva obtidos, tanto via rota ácida quanto rota básica (OLI2.5A e OLI2.5B, apresentarem atividade inibitória nula.

Entretanto, alguns extratos que apresentaram atividade inibitória significativa, não apresentaram o mesmo desempenho quando encapsulados como o urucum e o extrato de oliva. A concentração de extrato nos encapsulados bem como sua composição textural podem ser fatores determinantes para sua efetiva atividade.

Diante desses resultados, o tanino, o urucum e os extratos de oliva e de antocianina foram escolhidos para as etapas seguintes na presente investigação.

Os bioativos mencionados anteriormente foram então avaliados para elucidação dos fatores determinantes de eficiência quanto à ação antimicrobiana determinando-se o nível de encapsulamento na rede de sílica, morfologia e textura das partículas obtidas, bem como as propriedades fisicoquímicas através de diferentes técnicas analíticas que serão discutidas daqui em diante.

5.1.1 Extrato de oliva

Apesar do extrato de oliva puro apresentar atividade antimicrobiana fraca para *Bacillus cereus* esse mereceu atenção. Portanto, as amostras de extrato de oliva e extrato de oliva encapsulado (OLI2.5A) foram analisadas via GC-MS para fins comparativos de modo a evidenciar a presença dos compostos químicos constituintes principais do extrato no encapsulado.

A Figura 5 abaixo apresenta o espectro de massa do extrato livre indicando o fragmento m/z 287 como o de maior intensidade também identificado para o extrato encapsulado, sugerindo que o princípio ativo encontra-se inalterado no interior do material encapsulado.

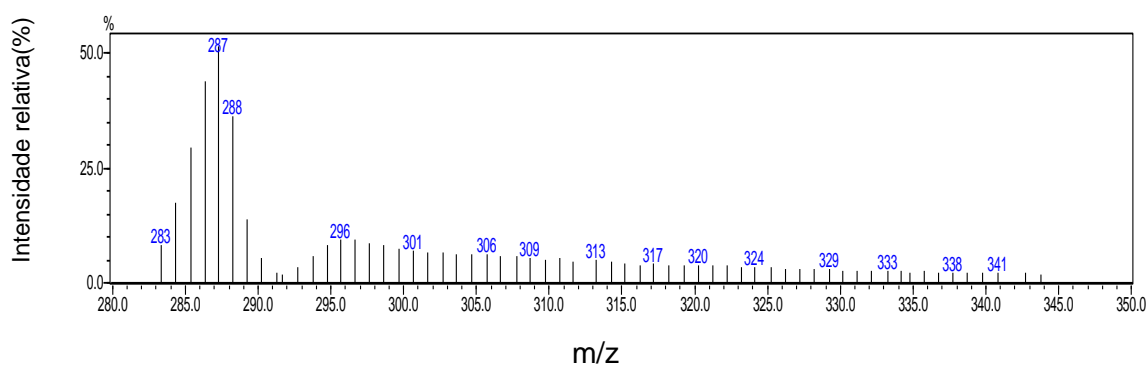


Figura 5. GC-MS do extrato de oliva puro.

A fim de elucidar a possibilidade de não liberação do extrato de oliva da rede de sílica durante o ensaio de ação antimicrobiana, uma quantidade em massa do encapsulado OLI2.5A foi imerso em água por algumas horas e após, analisada a solução resultante via CG-MS. Verifica-se similaridade do padrão de fragmentação em relação ao espectro obtido da solução do extrato puro confirmando lixiviação do material, o que sugeriu a interpretação de que provavelmente a concentração de extrato no encapsulado foi insuficiente para inibição dos microorganismos avaliados. Estudos futuros são necessários para otimizar as condições de encapsulamento desse material.

5.1.2 Antocianina

A partir dos resultados obtidos na pesquisa exploratória foram realizadas novas rotas de encapsulamento com extrato de antocianina buscando otimização dos mesmos para atividade antimicrobiana e correspondente caracterizações. As amostras de material encapsulado com extrato de antocianina foram preparadas alterando-se alguns parâmetros da rota sol-gel, a saber: concentração de extrato bem como tempo de adição do mesmo durante o processo. Os resultados para atividade antimicrobiana dessas amostras seguem na Tabela VIII.

Tabela VIII. Atividade antimicrobiana das amostras de antocianinas encapsuladas avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm)^a

Amostra	<i>E. coli</i> (gram-negativa)	<i>S. aureus</i> (gram-positiva)	<i>A. niger</i> (fungo)	<i>Candida sp</i> (levedura)	<i>B. c. aureus</i> (gram-positiva)
ANT11A	-	5,9 ± 0,9	-	-	-
ANT20A	-	9,6 ± 0,5	11,3 ± 0,5	-	-
ANT37A	-	11,2 ± 0,4	-	5,3 ± 0,7	-
ANT20A2h	-	20,0 ± 0,9	6,4 ± 0,4	-	-
ANT20A4h	-	19,1 ± 0,4	5,6 ± 0,5	-	-
ANT20A12h	-	17,0 ± 0,9	9,4 ± 0,6	-	-
ANT20A20h	6,7 ± 0,3	19,2 ± 0,6			
Controle A	-	-	-	-	-

^aZona de inibição (mm) incluindo o diâmetro do disco, de 5mm.

De modo geral, todas as amostras otimizadas apresentaram atividade satisfatória para *Staphylococcus aureus* (bactéria gram positiva), *Aspergillus niger* e *Candida sp* variando a intensidade, mas não apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos *Escherichia coli* (bactéria gram negativa), e *Bacillus cereus* (bactéria gram positiva), *Staphylococcus aureus*. Destacam-se dentre elas a amostra ANT11A, ANT20A, ANT37A e ANT20A6h obtidas via rota ácida como as de menor atividade e as amostras ANT20A2h e ANT20A4h como as de melhor atividade.

As amostras ANT20A2h, ANT20A4h, ANT20A12H e ANT20A20H são derivações da amostra ANT20A, porém com variação no tempo de adição do extrato de antocianina após o início do processo de obtenção do sol-gel de sílica: 2 horas, 4 horas, 12 horas e 20 horas respectivamente, visando deixar a antocianina mais na superfície externa do grão.

A preservação da funcionalidade e estrutura molecular após encapsulamento foi avaliada através de espectroscopia de ultra-violeta – visível por refletância difusa (UV-DRS), espectrometria de massa com eletroionização por eletrospray positivo e analisador por tempo de voo – (TOF MS) e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Os materiais encapsulados com antocianina foram analisados semi-quantitativamente via UV-DRS utilizando-se a banda de absorção 280 nm como referência para construção da curva de calibração visto que para as amostras obtidas via rota básica a banda de absorção em torno de 520 nm, característica do cátion flavínio é reduzida (Figura 6).

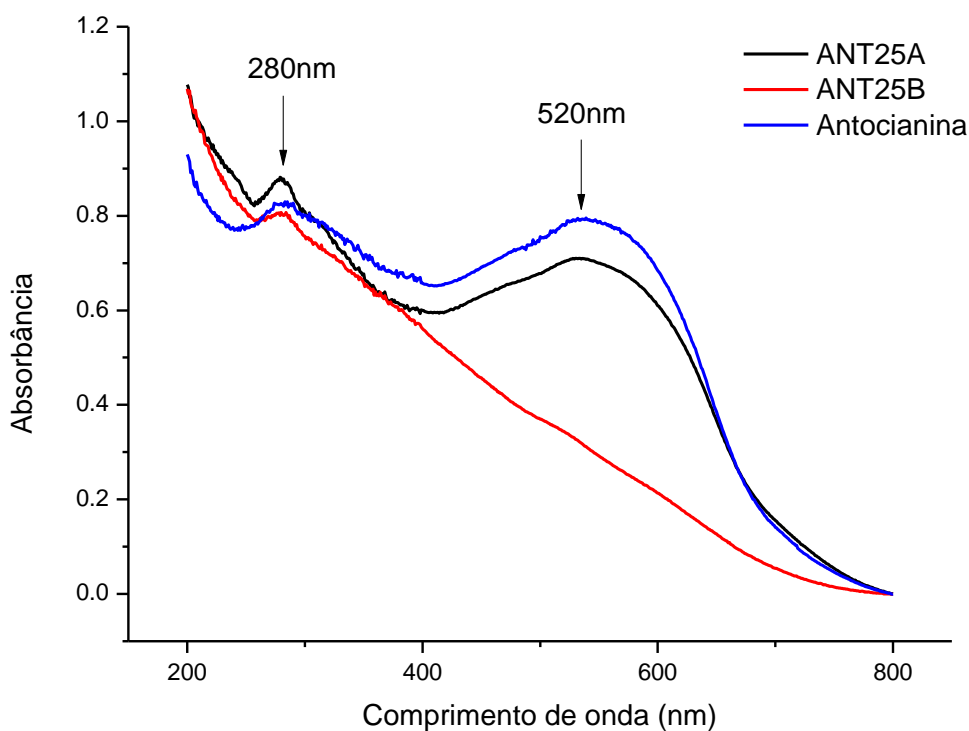


Figura 6. Espectro UV-Vis por DRS da antocianina e seus respectivos materiais encapsulados obtidos via rota ácida (ANT25A) e rota básica (ANT25B).

Realizou-se ensaio de lixiviação com amostra de material encapsulado que apresentou boa atividade antimicrobiana (ANT20A4h) e atividade ruim (ANT11A) através de medidas de concentração dos princípios ativos dos eluatos (amostras líquidas) por espectrometria no UV-visível. O procedimento do ensaio encontra-se descrito no capítulo Metodologia como Ensaio de lixiviação. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 7 e demonstram que a antocianina está presente no substrato e está sendo lixiviada ao longo do tempo quando em contato com solvente compatível (água) de maneira gradativa.

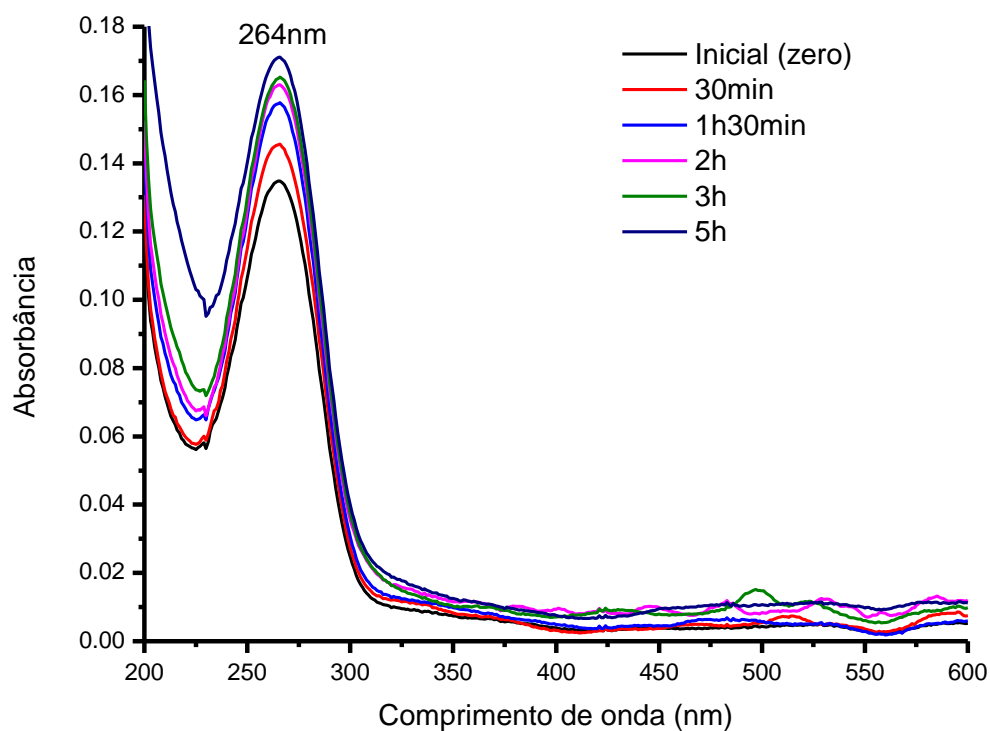


Figura 7. Espectro UV-vis do lixiviado da amostra ANT20A4h.

Na Figura 8 podemos comparar os resultados quantitativos obtidos para ambas amostras.

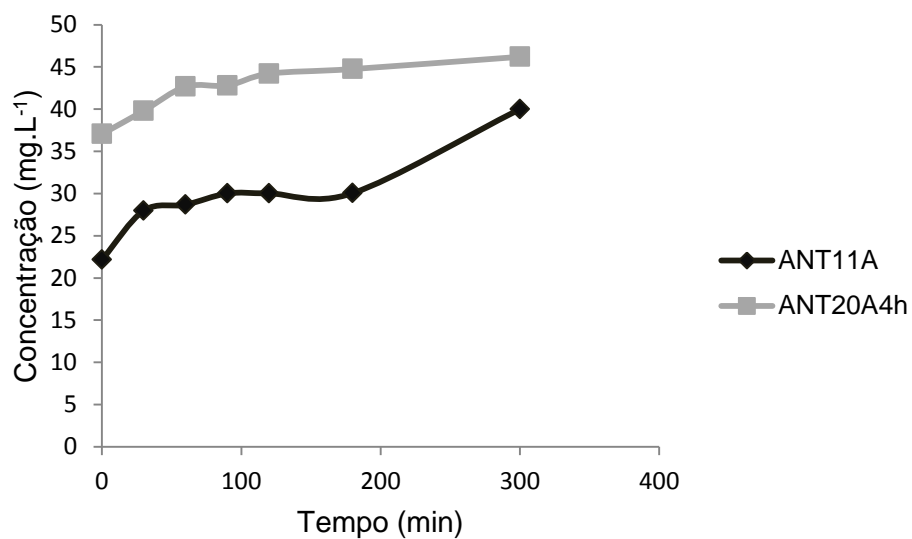


Figura 8. Concentração de antocianina lixiviada em meio aquoso em função do tempo. Resultado referente a uma única determinação.

De acordo com a Figura 8, a concentração de antocianina no lixiviado do encapsulado ANT20A4h foi superior ao longo do tempo se comparado ao ANT11A, porém observa-se aumento 24,7% na concentração do eluato de ANT20A4h e aumento de 80,4% na concentração do eluato de ANT11A após 5h indicando maior lixiviação do extrato ao longo do tempo para essa última.

Isso pode ser atribuído às concentrações iniciais de antocianina (ANT11A ~ 11%; ANT20A4h ~ 20%) e também às características morfológicas e texturais dos materiais. A amostra ANT11A apresenta um tamanho de poro três vezes menor que a ANT20A4h, porém uma área específica muito superior, aproximadamente 80 vezes maior. Nesse caso, a área específica maior pode facilitar a interação da antocianina imobilizada na rede de sílica com o solvente (água) devido aumento da superfície de contato. Quanto ao nível de organização das partículas, ambas as amostras apresentam as mesmas características. Portanto, não há interferência no processo de lixiviação dos materiais.

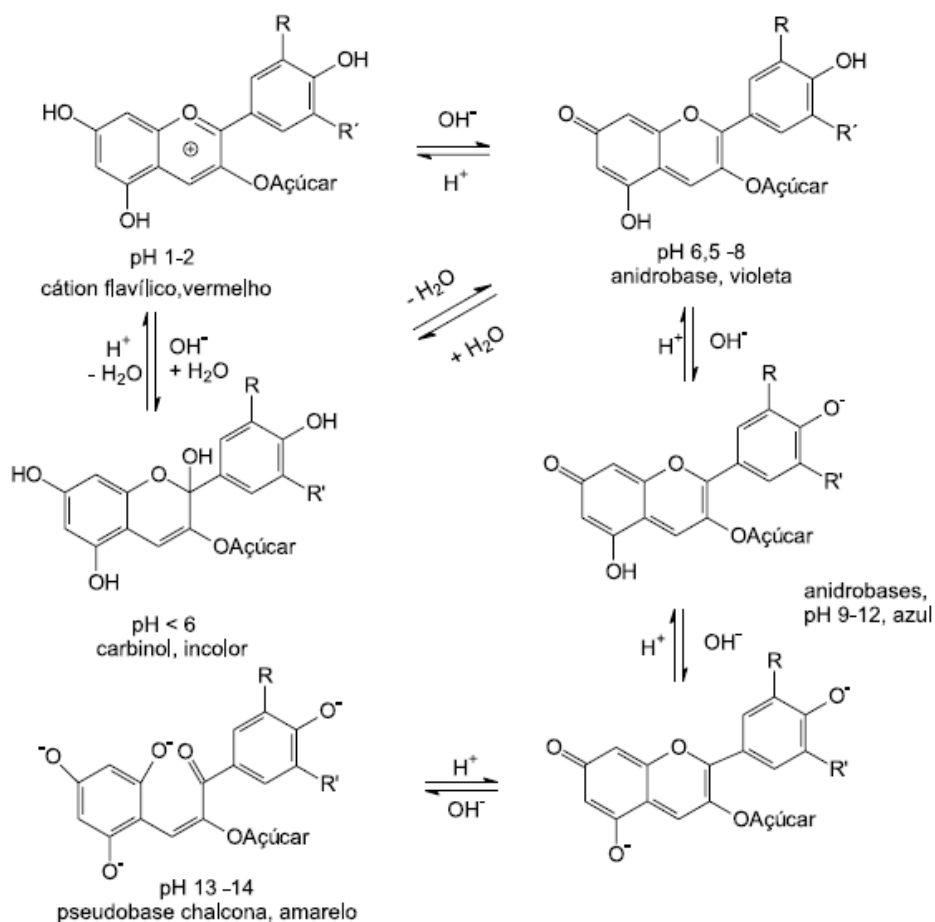
Além disso, estão ilustradas na Figura 9 as fotos das amostras de antocianina, encapsulada via rota ácida e encapsulada via rota básica, indicando a presença da antocianina na rede de sílica, devido à aquisição de sua cor característica (púrpura escuro) após processo sol-gel.



Figura 9. Fotos de antocianina pura (1), antocianina encapsulada via rota ácida (2) e antocianina encapsulada via rota básica (3).

As antocianinas apresentam grande suscetibilidade a alterações de pH sendo mais estáveis em soluções de pH ácido do que alcalino. O Esquema 20 apresenta as quatro estruturas químicas predominantes da antocianina quando a solução

passa de neutra a acidificada: a base quinoidal, o cátion flavínio, o carbinol ou pseudobase e a chalcona¹²⁴.



Esquema 20. Formas estruturais predominantes da antocianina em solução aquosa em diferentes faixas de pH. Adaptado de²⁵.

A coloração lilás da antocianina encapsulada via rota ácida deve-se a predominância da espécie cátion flavínio devido às condições da rota serem em pH próximo de 2, porém tal coloração não é observada no encapsulado obtido via rota básica visto que as condições da rota oferecem um meio alcalino inicialmente, mas que altera-se no decorrer da síntese devido à formação do sol-gel que gera subprodutos como o etanol durante sua síntese que acidificam o meio levando à predominância da espécie chalcona, incolor.

Nos espectros de absorção no infravermelho (Figura 10) observam-se alguns deslocamentos das bandas de absorção comparativamente à antocianina livre em relação às amostras encapsuladas tanto obtidas via rota ácida quanto rota básica.

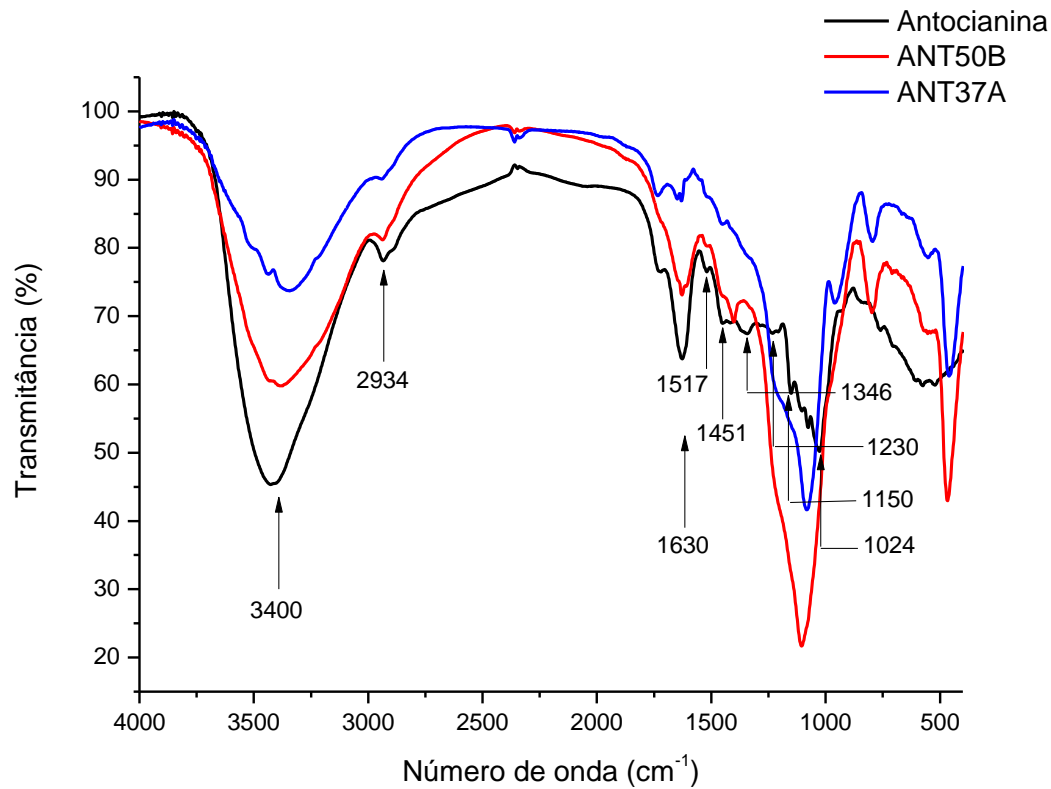


Figura 10. Espectro infravermelho das amostras de antocianina e respectivos encapsulados (ANT50B e ANT37A).

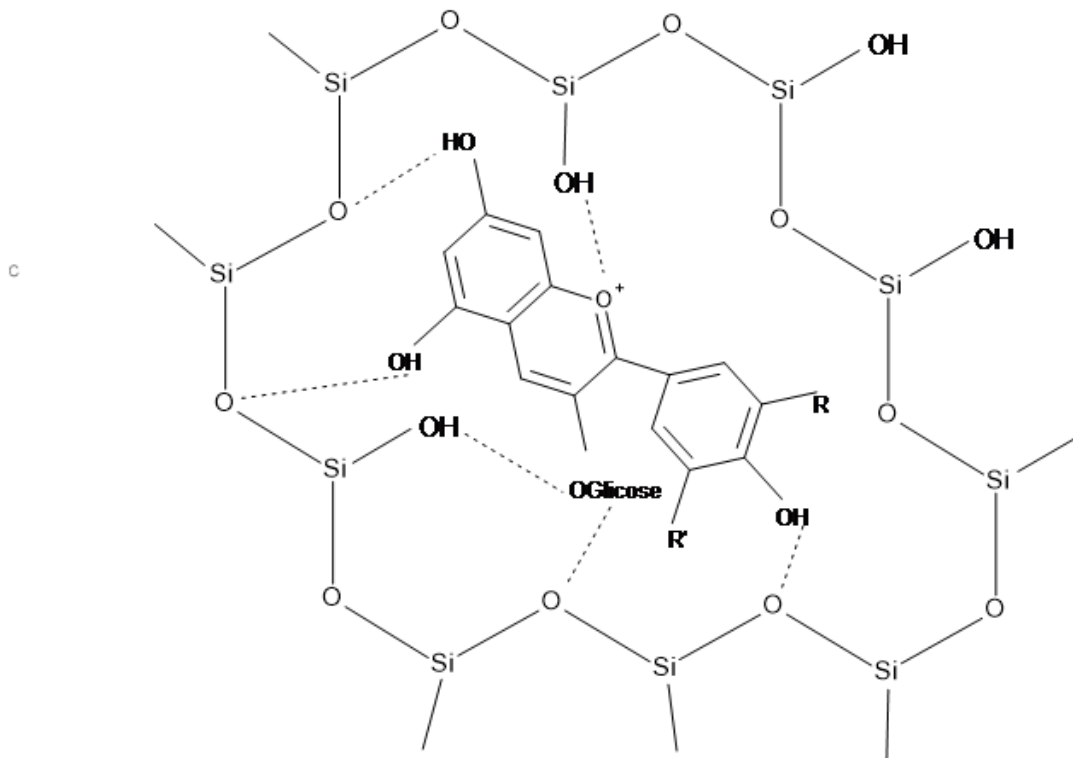
Na Tabela IX podemos compreender melhor essas alterações comparando os valores das bandas bem como os deslocamentos observados nos espectros de infravermelho obtidos.

Tabela IX. Atribuição das bandas obtidas no infravermelho para antocianina e encapsulado obtido via rota ácida e básica

Tipo de vibração	Número de onda (cm⁻¹)				
	Antocianina	ANT37A	Δ	ANT50B	Δ
Estiramento O-H	3400	3345	60	3376	29
Estiramento C=C-H	2934	2933	1	2934	0
Estiramento C.C	1630	1630	0	1630	0
Estiramento C=C	1517	-	-	1517	0
Estiramento C=C-C	1451	1451	0	-	-
Deformação angular C-O (fenol)	1346	-	-	-	-
Estiramento anel pirano	1230	-	-	-	-
Estiramento C-O (éter)	1150	-	-	-	-
Estiramento C-O (álcool)	1024	-	-	-	-

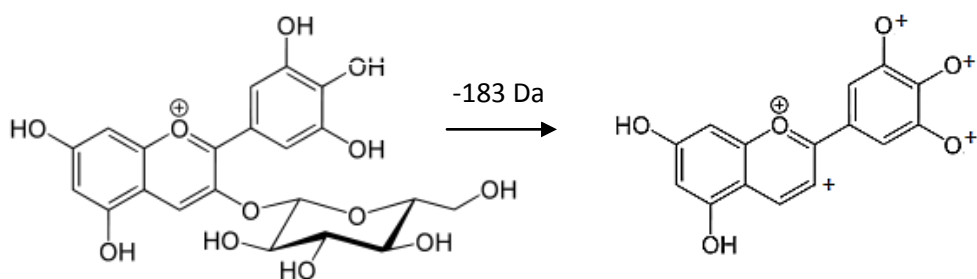
A banda de estiramento da vibração dos grupos hidroxila (O-H) e de ligações de hidrogênio entre estes grupos que para antocianina verifica-se em torno de 3405 cm⁻¹ com grande intensidade, atenua-se e desloca-se para 3376 cm⁻¹ quando encapsulada via rota básica e para 3345 cm⁻¹ quando encapsulada via rota ácida. Já as bandas de estiramento C-H de carbono aromático representada pela banda em 2934 cm⁻¹ e estiramento axial de (C-C) do anel aromático em torno de 1630cm⁻¹ não sofrem deslocamento após processo de encapsulamento.

As demais bandas identificadas no espectro de infravermelho da antocianina não são observadas ou não sofrem deslocamento considerável demonstrando que as interações ocorrem entre as hidroxilas presentes na estrutura da antocianina e os átomos de oxigênio do grupamento (-O-Si-O-) e as hidroxilas dos grupos silanóis (-Si-OH) da rede de sílica formada após síntese do material encapsulado possivelmente através de ligações de hidrogênio, conforme Esquema 21.



Esquema 21. Proposta de interações entre antocianina e a rede de sílica

Complementando a caracterização dos materiais encapsulados de antocianina realizou-se a análise de espectrometria de massas com o objetivo de verificar a preservação do extrato após rota de encapsulamento. Nos espectros obtidos, tanto para o antocianina livre, quanto para antocianina encapsulada via rota ácida e básica, o fragmento de maior intensidade foi o m/z 282 Da. Esse fragmento pode ser atribuído à quebra das ligações glicosídicas dos carbonos do anel pirano ligados aos grupamentos éteres conforme Esquema 22.



Esquema 22. Estrutura da principal antocianina presente no bioativo antes da fragmentação (m/z 465 Da) à esquerda e após fragmentação (m/z 282 Da).

Sendo assim, as técnicas de espectroscopia de UV-DRS, espectrometria de massa e espectroscopia no infravermelho demonstraram preservação das características estruturais após encapsulamento.

A Microscopia confocal de varredura a laser (CSLM) fornece imagens baseadas na fluorescência emitida pela amostra, proporcionando ampliações típicas de microscopia óptica. Utilizando o laser de comprimento de onda de 559 nm, as moléculas características do extrato de antocianina foram excitadas e através da leitura sequencial da intensidade de fluorescência em intervalos de comprimento de onda pré-definidos encontrou-se o máximo de emissão do bioativo de interesse.

A Figura 11 apresenta a micrografia (ampliação – 20 vezes) observada no intervalo de comprimento de onda em que a intensidade é máxima. A cor vermelha foi escolhida no próprio software de aquisição de dados (FV10 – ASW) para identificação do extrato de antocianina nas amostras.

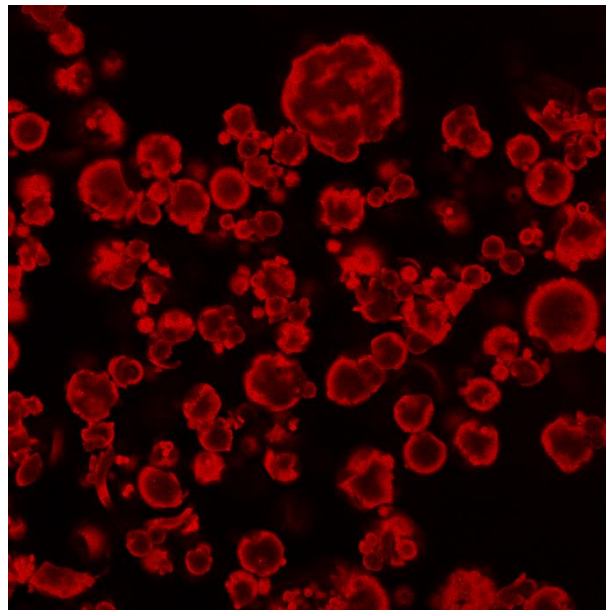


Figura 11. Micrografia da antocianina no intervalo de comprimento de onda em que a intensidade do extrato de antocianina é máxima

A Figura 12 exibe as imagens obtidas da resultante da projeção em z de vários planos focais (selecionado em 1 μm de espessura cada).

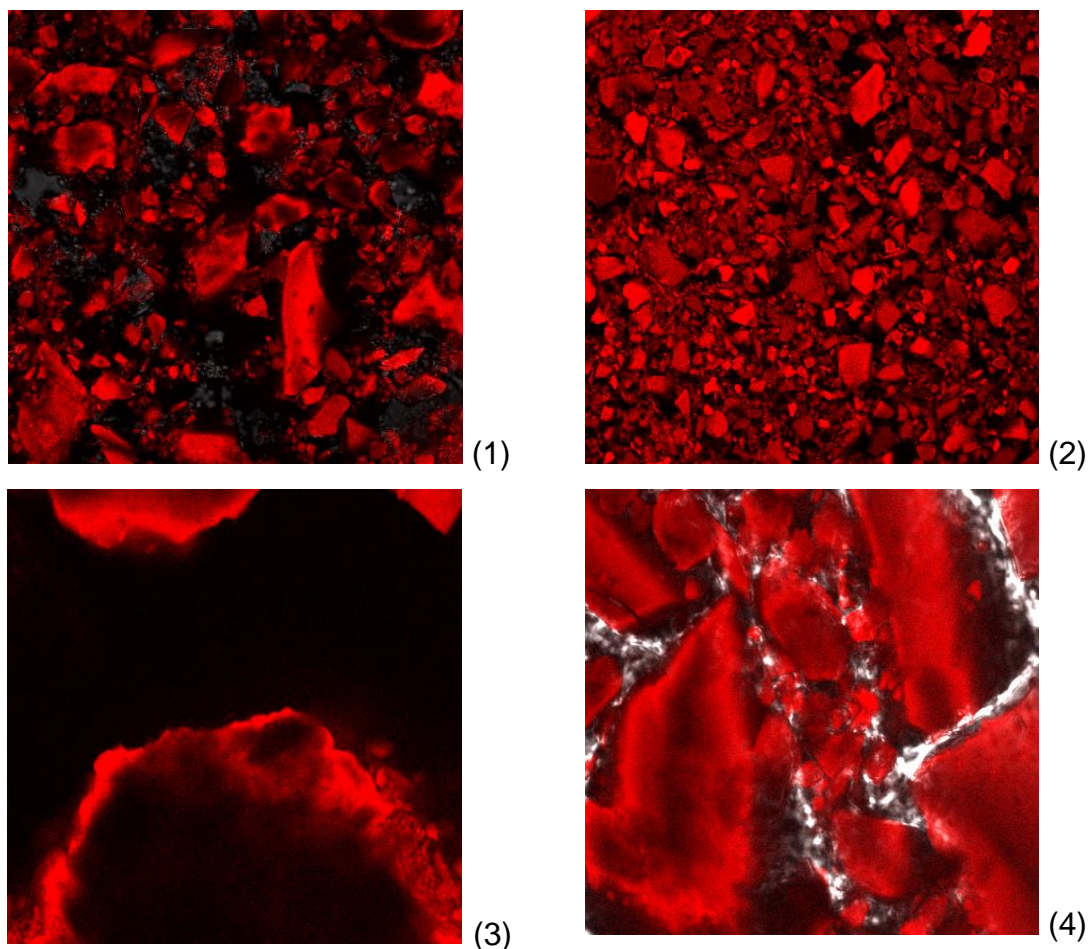


Figura 12. Micrografia dos encapsulados com antocianina ANT50B (1), ANT25A (2), ANT20A4H (3) e ANT11A (4).

Pelas imagens verifica-se que a fluorescência é observada em toda a extensão do grão, o que significa a existência de antocianinas em todo o volume do material encapsulado homogeneamente distribuídas.

Através dessas micrografias é possível ver diferença de tamanho de grãos gerados no colapso da estrutura do gel no processo de secagem classificando as amostras ANT50B e ANT25A como as de menor tamanho de grão e as amostras ANT20A4H e ANT11A como as de maior tamanho de grão.

Uma vez que, para cada amostra, variou-se potência do laser e a atenuação do ganho de sinal, as intensidades do brilho das imagens não são comparáveis a ponto de indicar a amostra com maior ou com menor teor de extrato de antocianinas incorporado. Entretanto, diferenças no teor do bioativo em uma mesma imagem podem ser claramente visualizadas, onde regiões de maior concentração

apresentam um brilho mais intenso. Portanto o bioativo encontra-se bem distribuído na superfície dos grãos mas com algumas regiões de maior aglomeração.

5.1.3 Tanino

A preservação da funcionalidade e estrutura molecular após encapsulamento foi avaliada através de espectrometria de infravermelho. A Figura 13 demonstra a presença de tanino na amostra de material desse bioativo encapsulado via rota básica (TAN25B).

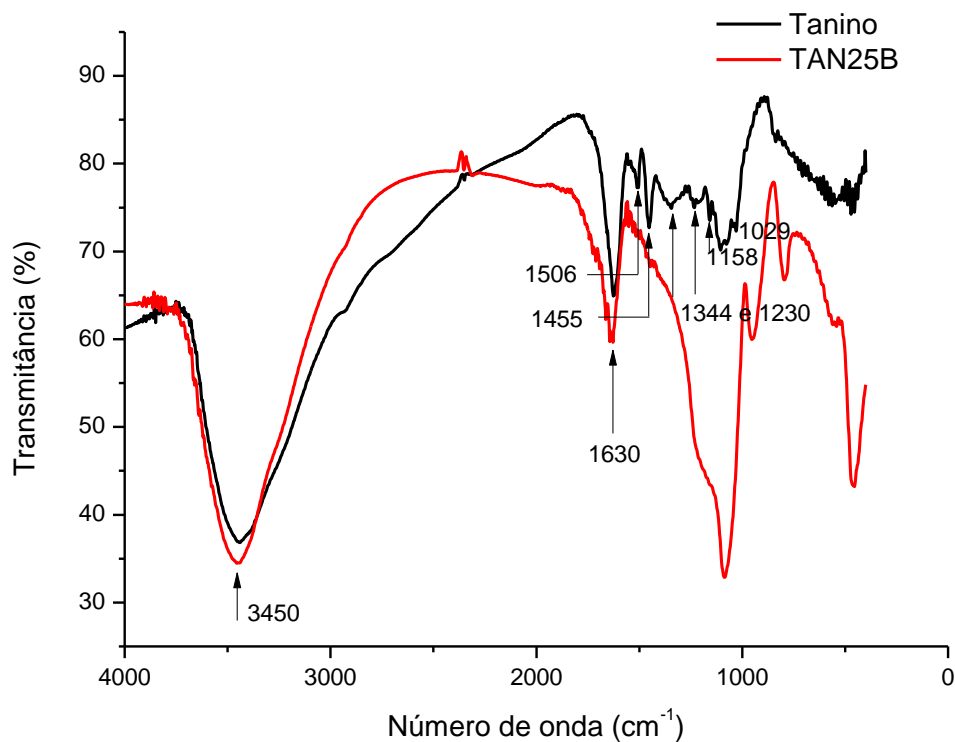


Figura 13. Espectro infravermelho das amostras de tanino livre e tanino encapsulado (TAN25B)

Os valores das bandas características do tanino em estudo comparativamente às identificadas em TAN25B encontram-se na Tabela X. Podemos observar que ocorreram alguns deslocamentos em que o Δ é superior a 4 cm⁻¹, resolução empregada.

Tabela X. Descrição do espectro de infravermelho de tanino e respectivos encapsulados

Tipo de vibração	Número de onda (cm ⁻¹)		
	Tanino	TAN25B	Δ
Estiramento O-H	3450	3442	12
Estiramento C-C	1630	1627	3
Estiramento C=C	1506	-	-
Estiramento C=C-C	1455	-	-
Estiramento C-O	1344	-	-
Estiramento C-O	1230	-	-
Estiramento C-OH	1158	-	-
Estiramento C-O	1029	-	-

Devido à estrutura do tanino, ser semelhante a da antocianina, também observa-se a banda de estiramento da vibração dos grupos hidroxila (O-H) e de ligações de hidrogênio entre estes grupos que, para o tanino, verificam-se em torno de 3450 cm⁻¹ com grande intensidade, porém atenua-se e desloca-se para 3442 cm⁻¹ quando encapsulado via rota básica. A banda em 1630 cm⁻¹ característica de estiramento axial de (C-C) do anel aromático não apresenta deslocamento significativo no material encapsulado, pois encontra-se em 1627 cm⁻¹. As bandas entre 1506 e 1455 cm⁻¹ de estiramento axial C=C e C-C do anel aromático e demais bandas abaixo de 1300 cm⁻¹ não são mais evidenciadas no espectro de TAN25B.

Os resultados indicam que as interações ocorrem entre as hidroxilas presentes na estrutura do tanino e os átomos de oxigênio do grupamento (-O-Si-O-) e as hidroxilas dos grupos silanóis (-Si-OH) da rede de sílica formada após síntese do material encapsulado possivelmente através de ligações de hidrogênio.

5.1.4 Urucum

A preservação da funcionalidade e estrutura molecular após encapsulamento foi avaliada através de espectroscopia de espectrometria de massa (CG-MS), FTIR e análise elementar. Nos espectros de infravermelho (Figura 14) observa-se deslocamento das bandas de transmitância comparativamente ao extrato de urucum puro em relação à amostra encapsulada obtida via rota ácida (URU25A).

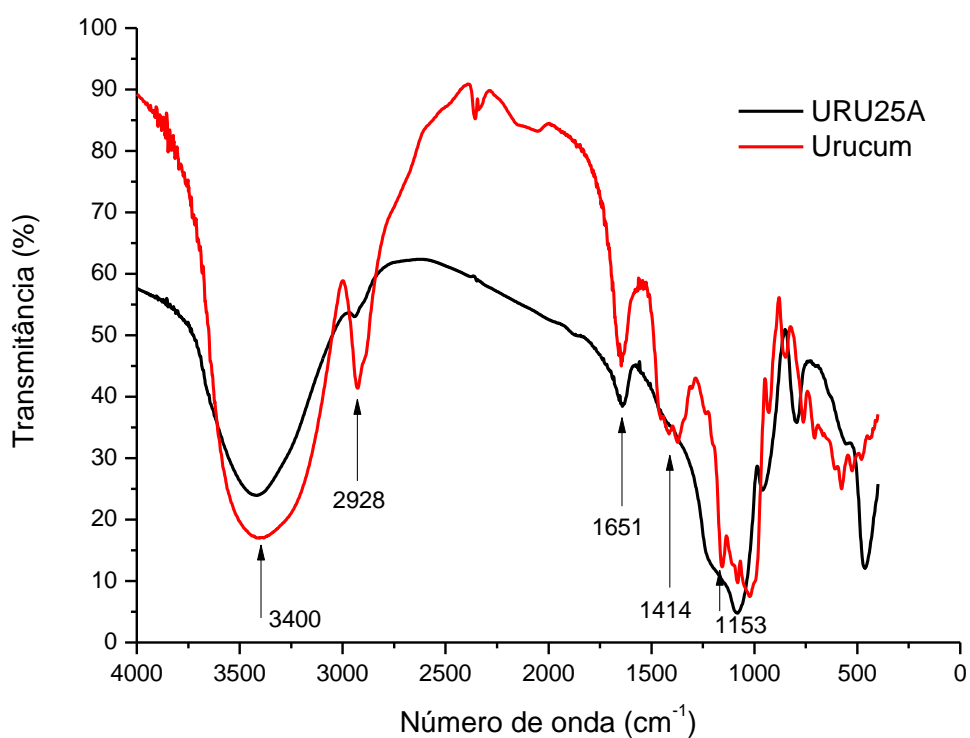


Figura 14. Espectro de infravermelho de extrato de urucum e material encapsulado (URU25A).

Os valores das bandas características do urucum em estudo, comparativamente às identificadas em URU25A, encontram-se na Tabela XI.

Tabela XI. Bandas obtidas no infravermelho para urucum e respectivo encapsulado (URU25A)

Tipo de vibração	Número de onda (cm ⁻¹)		
	Urucum	URU25A	Δ
Estiramento O-H	3403	3418	15
Estiramento C=C-H	2928	2937	8
Estiramento C=O	1640	1633	7
Deformação -COO-CH ₃	1414	-	-
Estiramento C-O	1153	-	-

A banda de estiramento da vibração dos grupos hidroxila (O-H) e de ligações de hidrogênio entre estes grupos que para o urucum verifica-se em torno de 3403 cm⁻¹ com grande intensidade, porém atenua-se e desloca-se para 3418 cm⁻¹ quando encapsulado via rota ácida. A banda de (-CH) de alceno que para o extrato verifica-se em torno de 2928 cm⁻¹ desloca-se para 2937 cm⁻¹ quando encapsulado e a banda de deformação axial de (C=O) em torno de 1640cm⁻¹ desloca-se para 1633cm⁻¹. Porém, as duas bandas características de deformação (-COO-CH₃) em 1414 cm⁻¹ e estiramento (C-O) em 1153 cm⁻¹ desaparecem após encapsulamento.

O deslocamento considerável das bandas 3403 cm⁻¹, 2928 cm⁻¹, e 1640 cm⁻¹ identificadas no espectro de infravermelho do urucum demonstra que as possíveis interações que ocorrem entre a rede de sílica e o bioativo são formadas entre os grupos funcionais (-COOH) e (-COOCH₃) presentes na estrutura do urucum (bixina e norbixina) e os átomos de oxigênio do grupamento (-O-Si-O-) e as hidroxilas dos grupos silanóis (-Si-OH) da rede de sílica formada após síntese do material encapsulado possivelmente através de ligações de hidrogênio.

5.2 CARACTERIZAÇÃO TEXTURAL E MORFOLÓGICA DOS MATERIAIS ENCAPSULADOS

A caracterização textural porosimétrica dos bioativos encapsulados foi realizada através de adsorção/dessorção de nitrogênio apresentando, na sua maioria, área específica pequena e tamanho de poro característico de estrutura

mesoporosa. Os dados texturais foram calculados através dos métodos BET e BJH. A avaliação textural morfológica foi realizada via SAXS (Espalhamento de Raio X a baixo ângulo) e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

5.2.1 Caracterização textural porosimétrica

O encapsulado de extrato de oliva (OLI2.5A) apresentou tamanho de poro de 24,29 Å, volume de poro de 0,097 cm³/g e área específica de 484,13 m²/g característico de estrutura mesoporosa² com área específica elevada.

Os materiais encapsulados de antocianina, tanino e urucum também apresentaram área específica, diâmetro e volumes de poro característicos de estrutura mesoporosa, apesar das grandes variações, conforme Tabela XII.

Tabela XII. Área específica, tamanho e volume de poro

Amostra	Área específica (m²/g)	Diâmetro de poro adsorção BJH (Å)	Volume de poro de adsorção BJH (cm³/g)
ANT10A	467,05	24,70	102x10 ⁻³
ANT11A	296,77	19,19	0,4x10 ⁻³
ANT20A	1,81	356,00	1x10 ⁻³
ANT25A	124,04	34,81	128x10 ⁻³
ANT20A2h	3,67	64,15	1,4x10 ⁻³
ANT20A4h	2,73	65,43	0,7x10 ⁻³
ANT20A12h	3,08	81,08	6,1x10 ⁻³
ANT20A20h	89,12	27,07	27x10 ⁻³
ANT37A	0,85	129,98	0,4x10 ⁻³
ANT25B	3,83	72,28	7,5x10 ⁻³
ANT50B	42,56	152,05	191x10 ⁻³
TAN25A	260,05	25,38	47x10 ⁻³
TAN25B	2,066	102,22	5x10 ⁻³
URU25A	143,35	27,06	130x10 ⁻³
Controle A	2,02	36,58	0,4x10 ⁻³
Controle B	13,49	166,17	67x10 ⁻³

A maioria dos materiais encapsulados obtidos via rota ácida apresentaram os maiores valores de área específica, o que corroboram com o descrito na literatura

² Segundo União Internacional de Química Pura e Aplicada: microporos $\varnothing < 20$ Å; mesoporos < 20 Å $\varnothing < 500$ Å e macroporos $\varnothing > 500$ Å.

¹²⁰. Ao contrário da rota ácida, a área específica dos materiais obtidos via rota básica foi pequena devido ao processo sol-gel em meio básico render materiais com uma morfologia mais compacta ¹¹⁷.

Dentre as amostras com maior área específica e volume de poro, entretanto menores diâmetros de poro destacam-se os encapsulados com extrato de antocianina ANT10A, ANT25A; com tanino TAN25A e com urucum URU25A. Essas amostras foram obtidas via rota ácida de uma relação molar (1:12:0,04) de TEOS: água:catalisador enquanto que as demais foram obtidas através de uma rota otimizada de relação molar (1:10:0,05). Isso demonstra que a relação molar entre o precursor, água e catalisador são fatores que influenciam diretamente na porosidade do material e ao diminuir a diferença molar entre precursor e água houve diminuição de área específica e conseqüentemente aumento de diâmetro de poro.

A amostra ANT11A apresenta-se como exceção o que pode ser explicado pela baixa concentração de extrato encapsulado, pois à medida que aumenta-se a concentração de extrato encapsulado nota-se diminuição gradativa de área específica.

Dentre os materiais derivados da ANT20A com variação de tempo de adição do extrato (ANT20A2h, ANT20A4h, ANT20A12h e ANT20A20h) nota-se aumento da área específica em relação a ANT20A porém mantendo-se constante até as 12 horas do início da síntese pois próximo do término do processo (~24h) em verifica-se aumento significativo da mesma.

As amostras obtidas via rota básica também apresentam baixa área específica similar àquelas obtidas via rota ácida otimizada.

5.2.2 Caracterização textural e morfológica

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é uma excelente ferramenta para a caracterização xerogéis, pois permite a elucidação da estrutura multi-escala de partículas com tamanho entre 1 e 100 nm. A curva de SAXS dos materiais apresenta uma estrutura formada por níveis de organização constituída por uma região de Guinier e por uma lei de potência. A região de Guinier permite uma estimativa do raio de giro (R_g), ou seja, o tamanho das partículas primárias,

enquanto que a região da lei de potência fornece detalhes a respeito da organização do sistema. A formação dos poros em materiais à base de sílica está relacionada com o mecanismo de agregação das partículas primárias. Em reações sol-gel, as partículas primárias possuem tamanho nanométrico e agem como núcleos para a formação do gel.

Uma curva de SAXS do material (OLI2.5A) é apresentada na Figura 15.

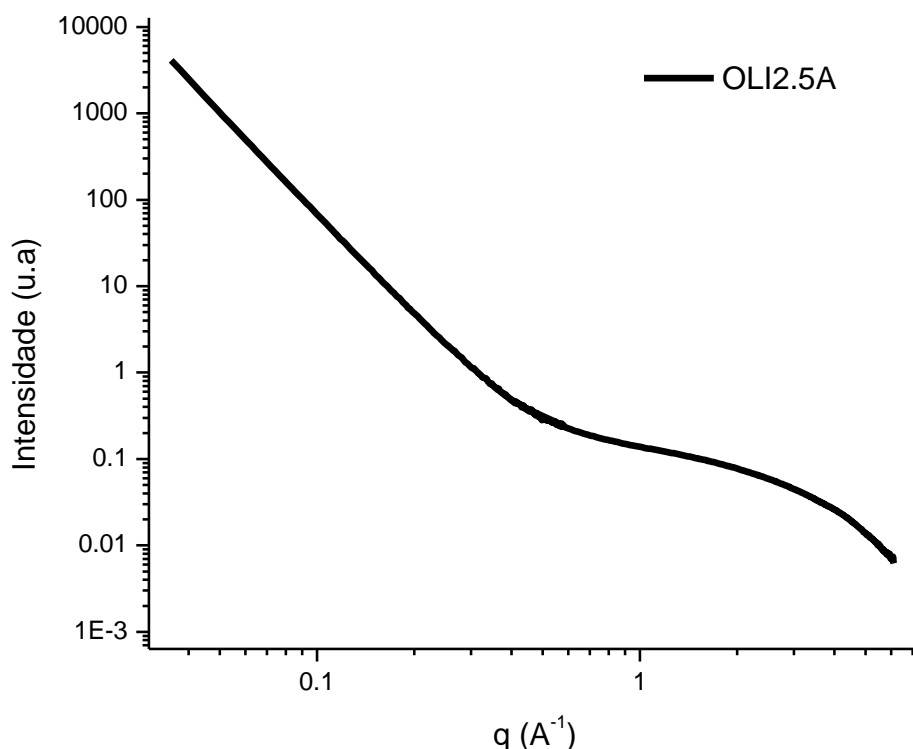
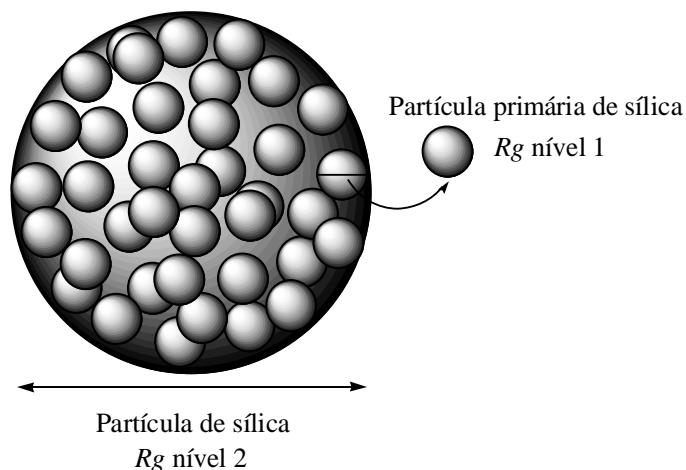


Figura 15. Curva de SAXS da amostra de extrato de oliva encapsulado (OLI2.5A).

De acordo com a Figura 15 as partículas que compõem o material são organizadas em uma estrutura multi-escala formada por dois níveis de organização. Através do ajuste do nível 1, localizado em região de q maior que 2 \AA^{-1} , pode-se determinar o raio de giro (R_g) das partículas primárias. O nível 2, situado em região de q menor que $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ fornece informação sobre a organização dessas partículas, ou seja, a respeito da estrutura fractal dos *clusters* (tamanho dos *clusters* = partículas secundárias) resultantes da agregação das partículas primárias (Esquema 23).



Esquema 23. Modelo de agregação de partículas primárias de secundárias

A estrutura do aglomerado de partículas primárias que constituem o Nível 2 pode ser obtida através da análise do expoente da lei de potência (Lei de Porod) na curva de espalhamento.



Esquema 24. Modelo de agregação dos clusters a) Fractal de massa b) Fractal de superfície c) Estrutura de Porod. Adaptado de ¹²⁶.

De acordo com o Esquema 24, se o expoente da lei de potência ($I \propto q^{-P}$) estiver entre 1,0 e 3,0, as partículas secundárias apresentam uma estrutura fractal de massa. Quando o expoente estiver entre 3,0 e 3,9, as partículas secundárias possuem uma estrutura fractal de superfície. No caso de um expoente igual a 4,0, têm-se partículas secundárias com núcleo denso e superfície uniforme.

Os resultados obtidos através do ajuste unificado das curvas de SAXS para a amostra OLI2.5A foram 0,48 nm para o R_g e 3,62 para o valor de P no nível 2 e R_p de 0,75 nm. Esses valores indicam que trata-se de partículas caracterizadas como fractal de superfície.

As curvas de SAXS dos encapsulados de antocianina estão apresentadas na Figura 16.

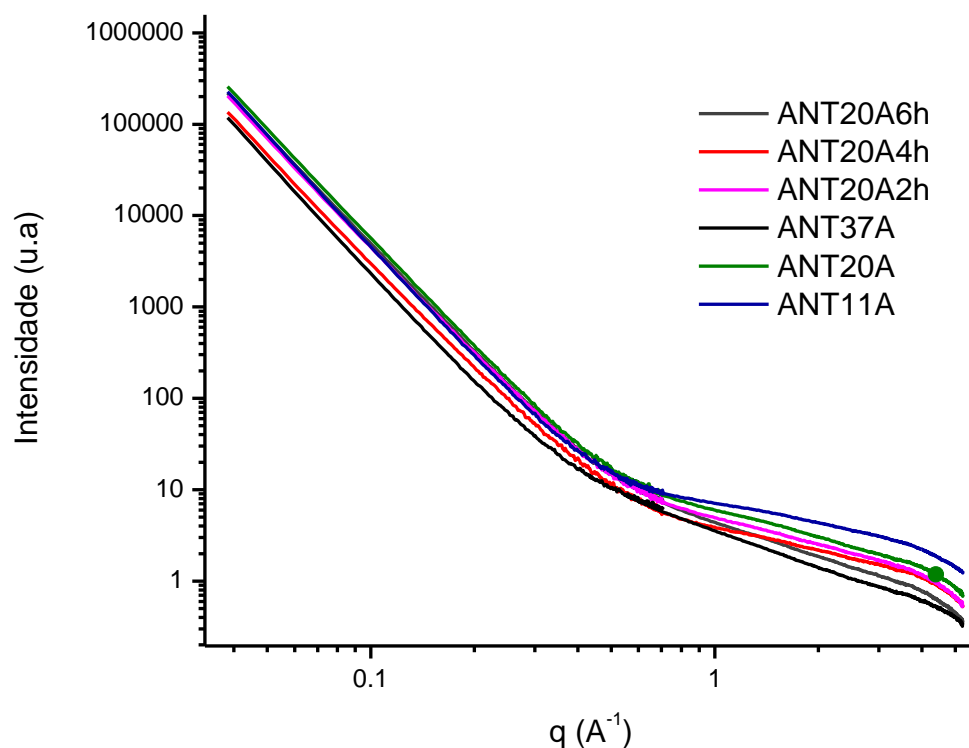


Figura 16. Curvas de SAXS dos materiais com antocianina encapsulada.

Os resultados obtidos através do ajuste unificado das curvas de SAXS para os materiais podem ser visualizados na Tabela XIII.

Tabela XIII. Raio de giro (R_g), valor de P no nível 2 e raio da partícula (R_p)

Amostra	R_g nível 1 (nm)	P nível 2	R_p (nm)
ANT11A	1,1	4,0	1,8
ANT20A	1,1	3,9	1,8
ANT37A	2,1	3,8	2,4
ANT20A2h	1,1	3,8	1,8
ANT20A4h	0,4	3,6	1,1
ANT20A6h	0,5	3,7	1,2
ANT20A12h	0,5	3,7	1,2
ANT20A20h	0,5	3,5	1,2
Controle A	0,8	3,5	1,5

Os valores de P no nível 2 não apresentam variações significativas mantendo-se entre 3,5 e 4,0. Esses valores indicam que tratam-se de partículas caracterizadas como fractal de superfície com exceção da amostra ANT11A em que o valor obtido de P foi 4,0, característica de estrutura de Porod (esfera).

Entretanto os valores de R_g e R_p indicam variações quanto ao tamanho das partículas devido à variação de concentração de extrato encapsulado e tempo de adição do mesmo durante o processo de síntese.

As amostras ANT11A e ANT20A apresentam resultados de R_g e R_p próximos de 1 nm e 1,8 nm respectivamente porém a ANT37A com aumento considerável de extrato encapsulado (~37%) tem seus resultados praticamente dobrados indicando que o aumento da concentração de extrato é diretamente proporcional ao aumento da partícula.

No entanto, ao variar o tempo de adição do extrato durante o processo observa-se o contrário: diminuição gradativa dos valores de P, R_g e R_p nas amostras sintetizadas com adição de antocianina após 4 h (ANT20A4h), 6h (ANT20A6h), 12h (ANT20A12h) e 20 h (ANT20A20h). Partindo de 3,9 para o valor de P da amostra ANT20A (adição do extrato no início da síntese) chega-se a 3,5 para a amostra ANT20A20h (adição do extrato após 20 h do início da síntese). Essa tendência também é observada para os valores de R_g e R_p que partem de 1,1 nm e 1,8 nm chegando a 0,5 e 1,2, respectivamente, quando comparadas as mesmas amostras.

Resultados similares foram obtidos para o tanino encapsulado via rota básica (TAN25B) conforme curva de SAXS (Figura 17). Através do ajuste unificado das

curvas: 0,2 nm para o R_g , 3,5 para o valor de P no nível 2 e R_p de 0,8 nm indicando partículas caracterizadas como fractal de superfície.

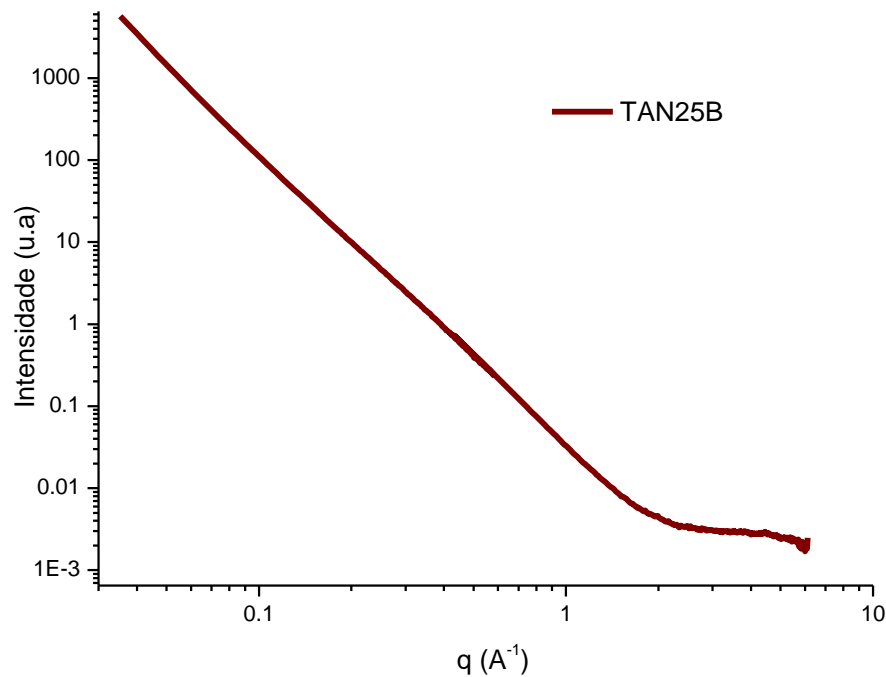


Figura 17. Curva de SAXS encapsulados de tanino (TAN25B).

Conforme mencionado anteriormente, além da técnica de SAXS para elucidação da morfologia dos materiais em estudo fez-se uso do SEM que fornece de maneira rápida informações sobre a morfologia.

As imagens (Figura 18) obtidas via SEM para os materiais encapsulados mostram que ANT20A2h apresenta superfície lisa com ranhuras, mas os encapsulados ANT37A e ANT50B apresentam superfície rugosa. Essas imagens reforçam os resultados obtidos via SAXS em que essas amostras foram caracterizadas como fractais de superfície, ou seja, estruturas com uma organização tendendo a esférica, mas com certa rugosidade.

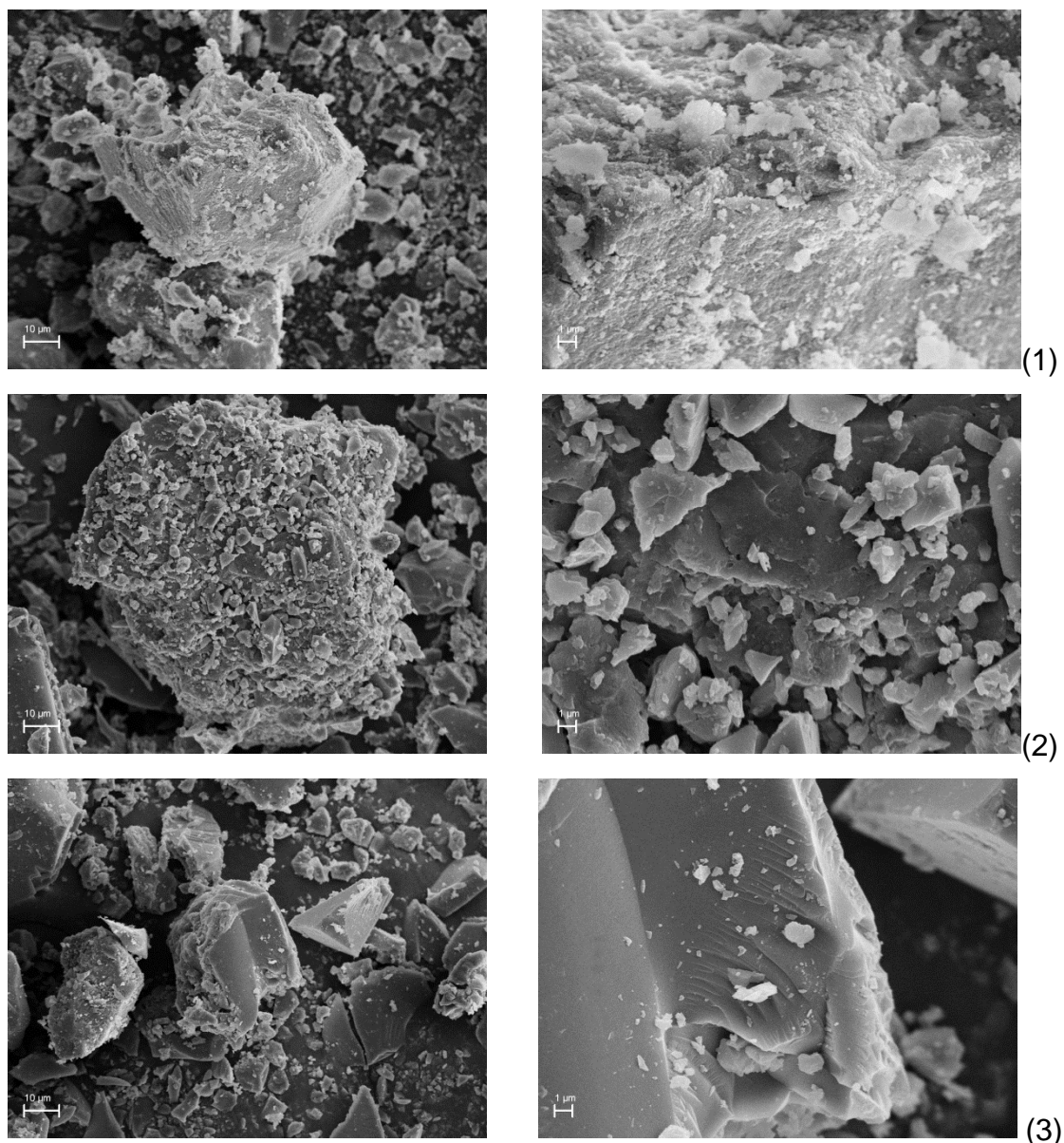


Figura 18. MEV do encapsulado, ANT50B (1), ANT37A (2) e ANT20A2h (3)

Nota-se que o aumento da concentração de antocianina no encapsulado aumenta significativamente o tamanho dos aglomerados de partículas comparando-se ANT37A (~37% extrato) e ANT20A2h (~20% extrato) obtidas via rota ácida.

As amostras de encapsulados com tanino apresentaram atividade antimicrobiana somente quando obtidas via rota básica como apresentado anteriormente. Partindo dessa informação foi realizada caracterização das amostras obtidas em ambas rotas, ácida e básica.

A imagens (Figura 19) obtidas via MEV para os encapsulados TAN25A e TAN25B mostram que ambos materiais apresentam superfície lisa com ranhuras.

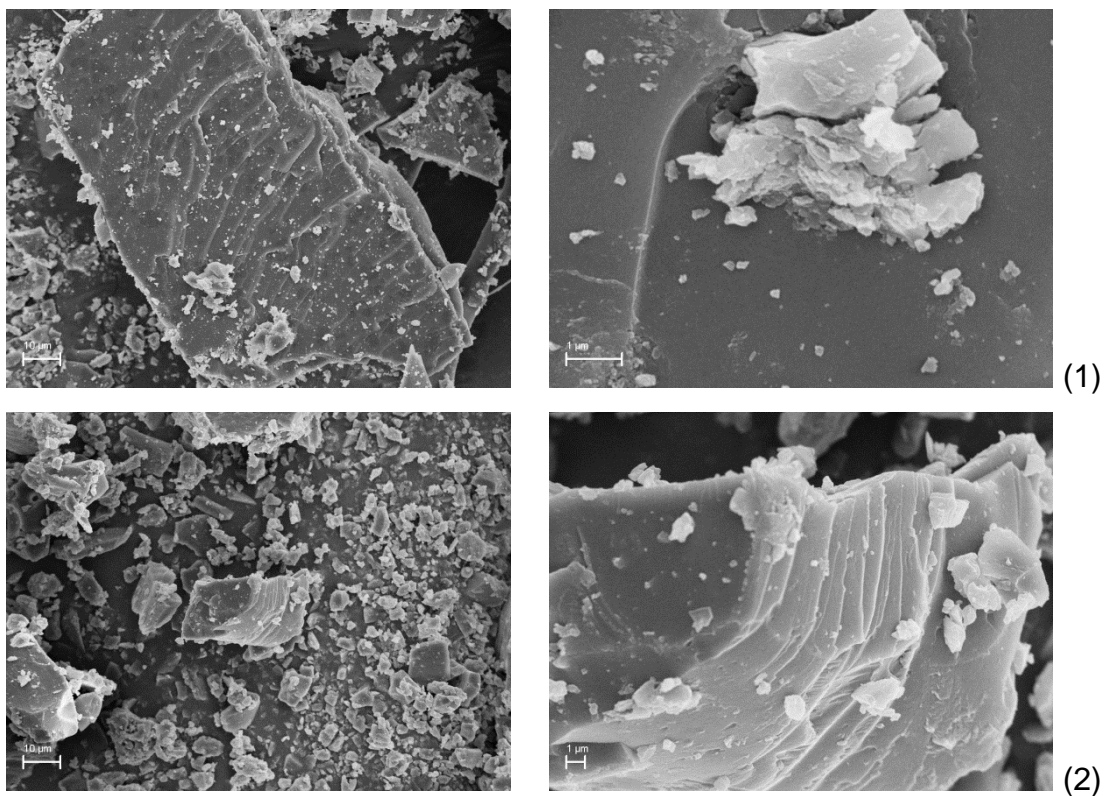


Figura 19. MEV do encapsulado TAN25A (1) e TAN25B (2)

Na literatura, as opiniões variam em relação ao efeito das características da superfície na adesão bacteriana. Alguns pesquisadores relatam que há uma correlação positiva entre adesão e aumento da rugosidade, enquanto outros pesquisadores não reportam nenhuma correlação entre a habilidade da bactéria aderir e irregularidades ou rugosidade das superfícies. Essa aparente divergência está relacionada com o nível de rugosidade estudada, com as espécies bacterianas estudadas, os parâmetros físico-químicos da superfície e o método usado para detectar a bactéria na superfície ¹²⁷.

Os resultados de ação antimicrobiana para as amostras TAN25B e ANT20A2h revelam que para esses sistemas, a superfície lisa com ranhuras desses materiais pode ter colaborado para maior interação dos bioativos em estudo com os microorganismos testados.

5.3 AVALIAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A influência do processo de encapsulamento na resistência térmica das amostras foi investigada através realização de curvas termogravimétricas (TGA) e sua derivada (DTGA) do extrato de antocianina e tanino, da amostra controle (sílica gel) e respectivamente encapsulados obtidos via rota ácida e básica numa faixa de temperatura de 30 a 600°C obtendo-se os seguintes resultados ilustrados na Tabela XIV abaixo:

Tabela XIV. Temperaturas de degradação de tanino e antocianina e respectivos encapsulados

Amostra	T_1 (°C)	T_2 (°C)	Perda de massa (%)
Antocianina	70	315	71,1
ANT25A	78	300	31,5
ANT50B	63	312	43,5
Tanino	45	266	71,3
TAN25A	56	271	33,3
TAN25B	60	306	23,2
Controle A	42,6	87,7	9,8
Controle B	52,7	202	19

A derivação da curva obtida para antocianina livre indicou uma temperatura máxima de degradação em torno de 315°C (T_2) com aproximadamente 71,1% de perda de massa total. Já a antocianina encapsulada via rota ácida (TAN25A - aproxim. 25% de antocianina) apresentou dois estágios de degradação: o primeiro pico máximo (T_1), foi em torno de 78°C que identificou a degradação de resíduos de água/etanol do processo de encapsulamento e perda de massa de 9,6% e o segundo pico foi em torno de 300°C com uma perda de massa de 19,2% totalizando 31,5% de perda de massa.

Já a antocianina encapsulada via rota básica (ANT50B - aproxim. 50% de antocianina) apresentou dois estágios de degradação. O primeiro pico máximo foi em torno de 63°C que identificou a degradação de resíduos de água/etanol do processo de encapsulamento e perda de massa de 3,4%. O segundo pico foi em

torno de 312°C, resultado da degradação da antocianina em cápsulas de sílica e mostrou uma perda de massa de 27,6% totalizando ao final 43,5%.

Os resultados mostraram diminuição da perda de massa para os materiais encapsulados sob a ação de temperaturas mais elevadas, porém sem apresentar consideráveis aumentos na temperatura de degradação. A diminuição de perda de massa pode ser explicada pela diminuição da concentração de matéria orgânica presente nos materiais encapsulados contendo antocianina.

Já a derivação da curva obtida para tanino indicou uma temperatura máxima de degradação em torno de 266°C com 71,3% de perda de massa total, mas, ao mesmo tempo a obtida para TAN25A (aproxim. 25% de tanino) apresentou dois estágios de degradação. O primeiro pico do encapsulado de tanino máximo foi em torno de 56°C que identificou a degradação de resíduos de água/etanol do processo de encapsulamento e perda de massa de 13,8%. O segundo pico foi em torno de 307°C, resultado da degradação do tanino em cápsulas de sílica e mostrou uma perda de massa de 22% totalizando ao final 33%.

Já a TAN25B (aproxim. 25% de tanino) apresentou três estágios de degradação. O primeiro pico máximo foi em torno de 58°C que identificou a degradação de resíduos de água/etanol do processo de encapsulamento e perda de massa de 5,3%. O segundo pico foi em torno de 306°C e o terceiro em 517°C resultado da degradação do tanino em cápsulas de sílica apresentando uma perda de massa de 11,8% e 19,6% respectivamente totalizando ao final 23,2%.

Os resultados mostraram um aumento de 5°C no aumento da estabilidade térmica para TAN25A (rota ácida) e 35°C TAN25B (rota básica) baseado na T_2 que está associado à diminuição da perda de massa sob a ação de temperaturas mais elevadas.

5.4 AVALIAÇÃO DE SINERGISMO TANINO X ANTOCIANINA

A antocianina foi o único bioativo livre que apresentou ação antimicrobiana contra o microorganismo *Escherichia coli* e quando encapsulada apresentou bons resultados para *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* e *Candida sp* que também

foram obtidos para o tanino porém com um pequeno acréscimo de eficácia (Tabela VII).

Diante dos resultados de ação antimicrobiana obtidos para tanino e antocianina livres e encapsulados, investigou-se o sinergismo entre ambos partindo do encapsulamento simultâneo via rota ácida e básica e da mistura amostras que demonstraram os melhores desempenhos para a aplicação mencionada.

A Tabela XV apresenta os resultados obtidos tanto para o encapsulamento simultâneo quanto para mistura de seus encapsulados obtidos separadamente. A concentração de ambos bioativos foi diminuída em 50% tanto em relação às amostras de partida ANT522h e TAN25B devido a mistura ser na proporção (1:1) quanto para o encapsulamento simultâneo. Para esse último, as amostras receberam uma codificação formada pelas duas primeiras letras de cada bioativo seguido da letra A (rota ácida) e B (rota básica): ATA e ATB.

Tabela XV. Atividade antimicrobiana dos extratos puros e dos antibióticos (Cloranfenicol e Gentamicina) de referência, avaliada através do ensaio de difusão em disco (mm)^a

Amostra	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>
ANT522h	-	20,0 ± 0,9	6,4 ± 0,4
TAN25B		21,7 ± 0,6	-
ATA	-	10 ± 1	Não testado
ATB	-	-	Não testado
ANT522h + TAN25B (1:1)	-	12,6 ± 0,6	7,8 ± 0,3
GEN20A	24,6 ± 0,9	11,2 ± 0,8	
AMP20A	19,4 ± 1,1	-	

^aZona de inibição (mm) incluindo o diâmetro do disco, de 5mm. Dados referentes à média de três replicatas ± desvio padrão.
(-) inibição não detectada.

As amostras, ATA e ANT522h + TAN25B (1:1), apresentaram atividade antimicrobiana moderada para *S.aureus* comparado aos antibióticos gentamicina e ampicilina encapsulados (GEN20A e AMP20A) mas não apresentaram atividade para *E. coli*, enquanto que a ATB não apresentou para nenhum dos microorganismos testados confirmando resultados anteriores para antocianina, que quando encapsulada via rota ácida apresenta atividade antimicrobiana nula. Portanto, o sinergismo não ocorre de maneira efetiva para ambos casos estudados:

bioativos encapsulados separadamente seguidos de mistura mecânica e bioativos encapsulados simultaneamente via rota ácida visto que separadamente as amostras de tanino e antocianina encapsuladas apresentaram resultados melhores quanto a atividade antimicrobiana.

Os valores das bandas características do espectro de infravermelho das amostras ATA e ATB (Figura 20) encontram-se na Tabela XVI.

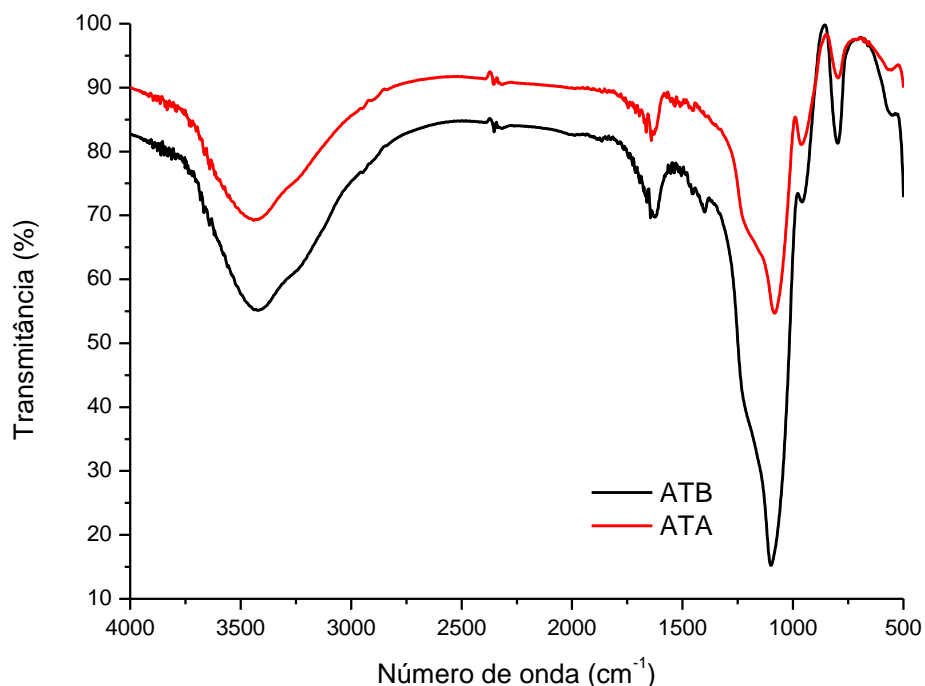


Figura 20. Espectro de infravermelho de ATA e ATB.

Tabela XVI. Descrição do espectro de infravermelho de ATA e ATB

Tipo de vibração	Número de onda (cm⁻¹)	
	ATA	ATB
Estiramento O-H	3427	3429
Estiramento C-C	1625	1625
Estiramento C-O	1074	1074

As fórmulas estruturais das antocianinas e taninos são semelhantes e, portanto as funções orgânicas presentes em ambos bioativos também. Isso impede diferenciar ambos bioativos através desse tipo de técnica analítica no encapsulado.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos que são facilmente oxidados são geralmente os melhores antioxidantes (moléculas que podem doar um elétron livre ou átomos de hidrogênio para reagir com radicais livres). As antocianidinas e antocianinas têm mostrado uma atividade antioxidante superior às Vitaminas C e E. Esses compostos são capazes de capturar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio fenólicos ⁹⁸.

Na determinação da atividade antioxidante da antocianina livre e encapsulada pelo método ABTS, esse radical é reduzido com concomitante descoloração (azul esverdeado claro para incolor) na presença de antioxidantes com doação de hidrogênio.

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato de antocianina que conforme literatura já é comprovada, e das amostras de encapsulado obtidos via rota ácida (ANT11A e ANT20A4h) e rota básica (ANT25B) que apresentaram resultado insatisfatório e satisfatório quanto a inibição microbiana, determinou-se atividade antioxidante de diferentes quantidades dos materiais em função do tempo visto que no caso dos encapsulados ocorre a liberação gradativa do extrato ou não conforme ensaio de lixiviação.

Estudos anteriores provaram que as antocianinas tem um potencial redox suficiente para reduzir o ácido ascórbico agindo como um eletrón doador, por um mecanismo envolvendo a transferência simultânea de um eletrón e um próton ⁹⁶.

A Tabela XVII mostra os resultados obtidos em que a antocianina livre apresenta desempenho muito superior ao dos encapsulados. Isso pode ser atribuído a concentração do composto livre no meio em contato com o ABTS ser muito superior a liberada pelos encapsulados que já encontram-se diluídos na rede de sílica.

Tabela XVII. Atividade antioxidante do extrato de antocianina e seus encapsulados.

Amostra	Quantidade (mg)	Atividade capturadora do radical ABTS (%) no decorrer do tempo (horas)			
		0	1	2	12
Antocianina	0,2	14,00	13,74	13,96	14,02
	0,4	22,01	21,99	22,11	22,09
	0,6	24,19	24,80	23,88	23,66
	0,9	40,92	41,50	41,08	41,73
	1,1	72,89	73,21	72,95	73,01
ANT11A	0,5	0,62	0,71	0,70	0,78
	1,0	1,58	1,50	1,48	1,97
	2,0	1,76	1,73	1,95	2,15
	5,0	1,84	2,13	2,66	3,09
ANT20A4h	0,5	0,78	0,80	0,84	1,11
	1,0	2,72	2,55	2,86	3,05
	2,0	4,15	4,32	4,58	5,76
	5,0	8,38	12,96	13,01	13,88
ANT25B	0,5	5,73	6,01	6,11	5,91
	1,0	7,02	6,91	7,14	7,16
	2,0	11,60	11,60	11,37	11,14

A quantidade de material influencia diretamente os resultados norteando para futura aplicação em alimentos. Os dados obtidos para antocianina livre indicam uma homogeneidade da atividade antioxidante ao longo do tempo obtendo-se atividade máxima de aproximadamente 73% para 1,1 mg do material, dentre as quantidades analisadas. O resultado obtido vem de encontro com os dados da literatura, pois em pesquisa envolvendo avaliação do potencial antioxidante de vegetais bastante pigmentados, ricos em antocianina, a atividade antioxidante varia numa de faixa de 54,91% a 81,94% ¹²⁸.

Porém, dentre os materiais encapsulados, a amostra que apresentou melhor resultado foi a ANT25B com atividade máxima de aproximadamente 11% para 2,0 mg do material. Ao comparar esse resultado com o resultado obtido para 0,6 mg de antocianina livre em que as concentrações do bioativo são aproximadamente equivalentes, verifica-se uma atividade antioxidante superior, ou seja, 13% mais que para o material encapsulado, demonstrando que a antocianina quando livre é mais efetiva do que quando encapsulada.

A amostra ANT25B também apresentou homogeneidade de resultados no decorrer do tempo enquanto ANT11A e ANT20A4h não. Verifica-se então que a quantidade de extrato foi liberada num único momento ao contrário das amostras ANT11A e ANT20A4h que observa-se lixiviação gradual e lenta do material.

O desempenho da amostra ANT11A foi ainda inferior ao da amostra ANT20A4h mas isso se explica pela diferença de concentração do extrato já que essa última tem o dobro da primeira.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO FILME ATIVO E INDICADOR

A caracterização do filme indicador foi realizada utilizando espectroscopia na região do ultravioleta-visível para comprovar a impregnação do material encapsulado contendo antocianinas no filme polimérico de quitosana/PVA além de análise térmica e mecânica e avaliação da sua funcionalidade através da variação total de cor.

5.6.1 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível por Refletância Difusa (DRS)

A Figura 21 mostra que o filme de quitosana/PVA sem antocianina (filme controle) não tem absorção significativa nas regiões do ultravioleta-visível. Já no espectro do filme indicador observa-se uma máxima absorção em 280 nm e próximo a 520 nm, absorções características da antocianina.

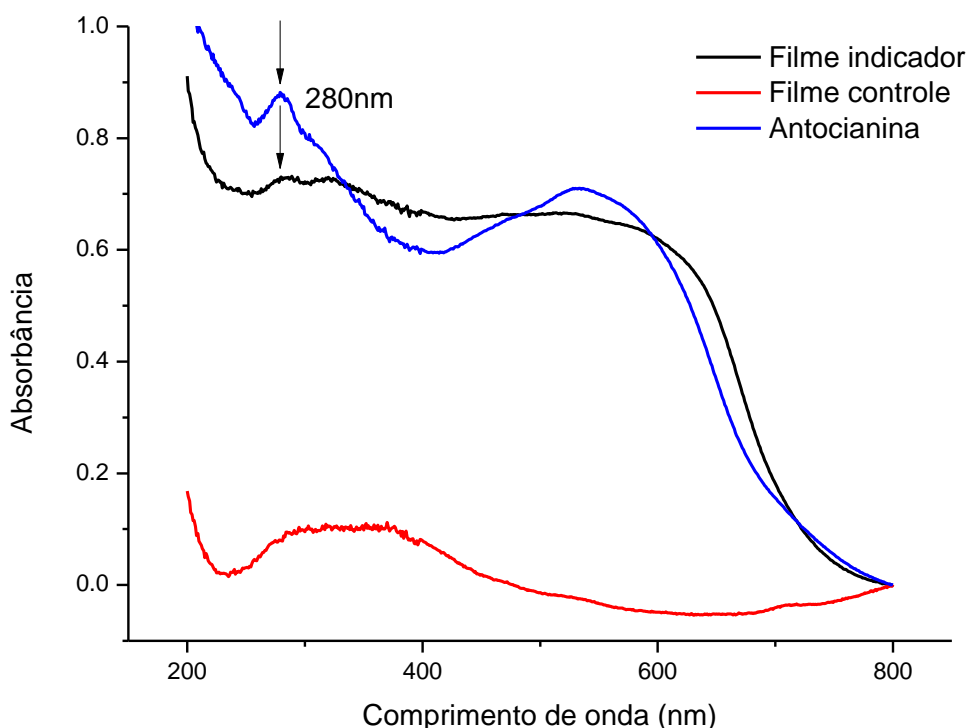


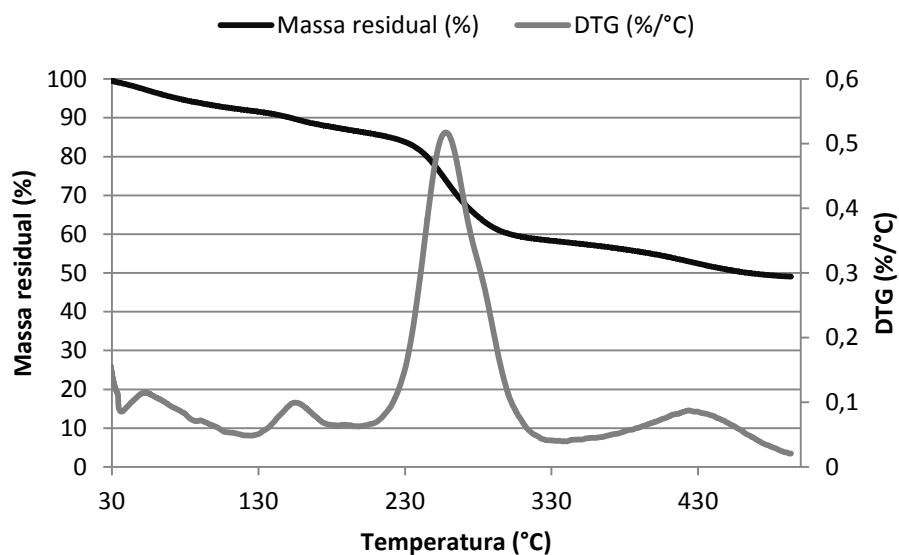
Figura 21. Espectro no UV-Vis (DRS) da antocianina, filme controle e do filme indicador.

Esse resultado confirma a incorporação do material encapsulado contendo antocianina no filme de quitosana/PVA.

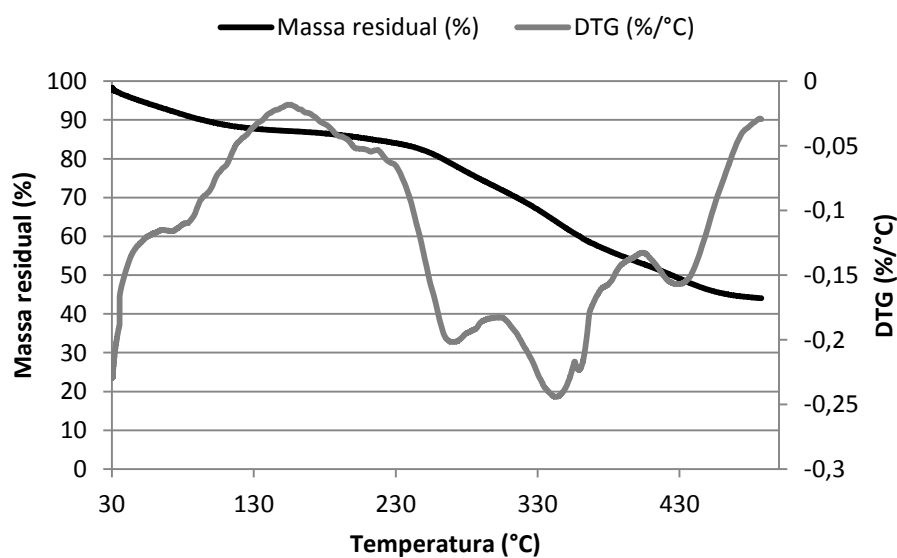
5.6.2 Análises térmicas – Termogravimetria (TGA) e Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

O TGA foi usado para investigar a distribuição de água dentro dos sistemas e para definir os limites de temperatura para aplicação do filme indicador comparativamente ao filme controle e o DSC como medida de fluxo de calor, para identificar possíveis alterações de mudança de fase sem que haja variação de massa, que por TGA não seria possível determinar, como também fusão e cristalização.

O comportamento térmico do filme indicador e do filme controle (sem antocianina) frente ao aquecimento controlado encontram-se nos termogramas apresentados na Figura 22.



(A)



(B)

Figura 22. Curvas TGA do filme indicador (A) e do filme controle (B).

Na curva de TGA do filme indicador foi observado perda de massa em 4 etapas. A primeira etapa de perda de massa 7,3%, entre 30°C e 105°C, foi devido à perda de massa de água superficial do material. A segunda etapa de perda de

massa 12,5% ocorrida entre 180°C e 220°C foi devido à liberação da água intrínseca no filme. O processo de decomposição do filme indicador iniciou em 230°C e prosseguiu até 500°C em duas consecutivas etapas com perdas de massa de 41,5% e 50,9% respectivamente, correspondendo à 3ª e 4ª etapas. Nesse intervalo observa-se um pico máximo em 257°C indicando a presença do encapsulado de antocianina incorporado ao material polimérico.

A curva TGA do filme de quitosana/PVA (filme controle) indica 2 etapas de perda de decomposição térmica com a liberação de água superficial adsorvida no material. A primeira etapa ocorre entre 30°C e 170°C e a perda de massa é de 11,3%. O processo de decomposição do filme controle foi similar ao do filme controle iniciando em torno de 230°C e prosseguindo até 500°C com perda de massa total de 53,9%.

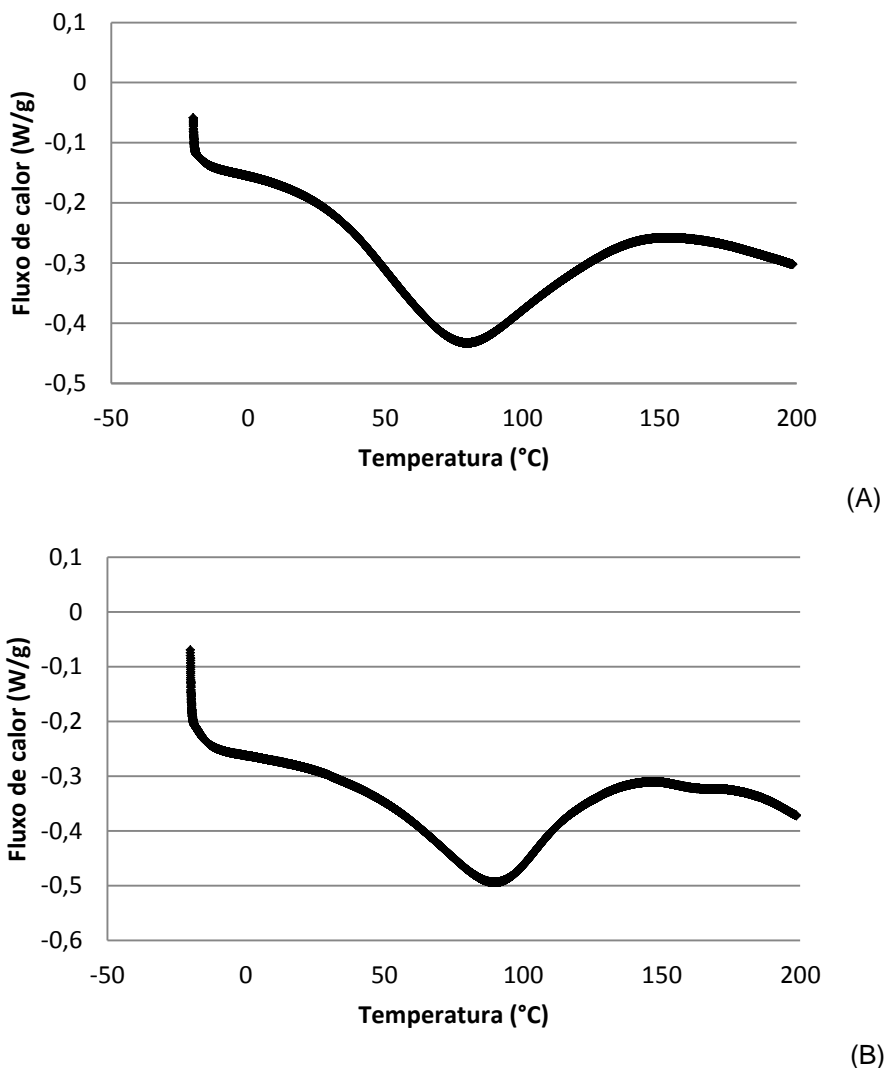


Figura 23. Curvas DSC do filme controle (A) e do filme indicador (B)

As curvas DSC mostram a formação de um pico endotérmico em 70°C para o filme controle e 90°C para o filme indicador representando a temperatura de fusão do polímero em estudo (Figura 23). Houve um aumento da temperatura de fusão com incorporação do encapsulado em sílica.

5.6.3 Espessura dos filmes e teste de resistência à tração

As propriedades mecânicas de um filme de quitosana/PVA são importantes para manutenção da integridade estrutural de um produto bem como proteção física e controle de velocidade de liberação¹³.

Os valores das propriedades mecânicas foram obtidos das curvas de deformação x força para o filme controle e filme indicador indicando que o filme controle é mais flexível, porém menos resistente que o filme indicador. A Tabela XX mostra os resultados obtidos das medidas de espessura (mm), tensão de ruptura ou resistência à tração³(MPa) e deformação na ruptura⁴ (%).

Tabela XX. Espessura dos filmes e resultados do teste de tensão: força máxima e alongação de ruptura (direção axial) do filme controle e do filme indicador

Amostra	Espessura (mm)	Deformação na ruptura (%)	Tensão de ruptura (MPa)
Filme controle	0,104 ± 0,014	34,9 ± 8,6	0,9 ± 0,2
Filme indicador	0,137 ± 0,022	7,4 ± 3,6	19,4 ± 2,5

Os valores obtidos de deformação na ruptura e tensão de ruptura apresentaram diferenças significativas. A presença do encapsulado de antocianina em sílica na matriz do filme alterou a força necessária aplicada para ruptura do filme indicador em aproximadamente 20 vezes comparado ao filme controle. Entretanto a

³ Resistência à tração: Máxima tensão ao qual o material resiste antes da ruptura sob tração. Maiores informações são apresentados na norma BS 4618: Seção 1.3.

⁴ Deformação na ruptura: Aumento do comprimento de um corpo de prova causado por uma tensão de tração, no momento da ruptura, em relação ao comprimento original do corpo de prova (Disponível em:

http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm_tecnico/Tabela_de_Propriedades_d_e_Referencia_dos_Compostos_de_PVC.pdf - Acesso em 09/02/2015).

deformação na ruptura diminuiu em torno de 30% tornando o mesmo mais rígido. Isto pode ser associado a sítios menores disponíveis reduzindo as interações das moléculas de água com a matriz filmogênica já que essas moléculas de água podem agir como plastificante na estrutura do filme.

5.6.4 Determinação dos parâmetros dinâmicos do filme indicador – Variação total de coloração

Antes da determinação dos parâmetros dinâmicos do filme indicador através da variação total de coloração foi determinada a curva de degradação do filé de peixe Tilápia (Figura 24) sob as mesmas condições, demonstrando a degradação alcalina do mesmo frente ao aumento da contagem bacteriana total (CBT).

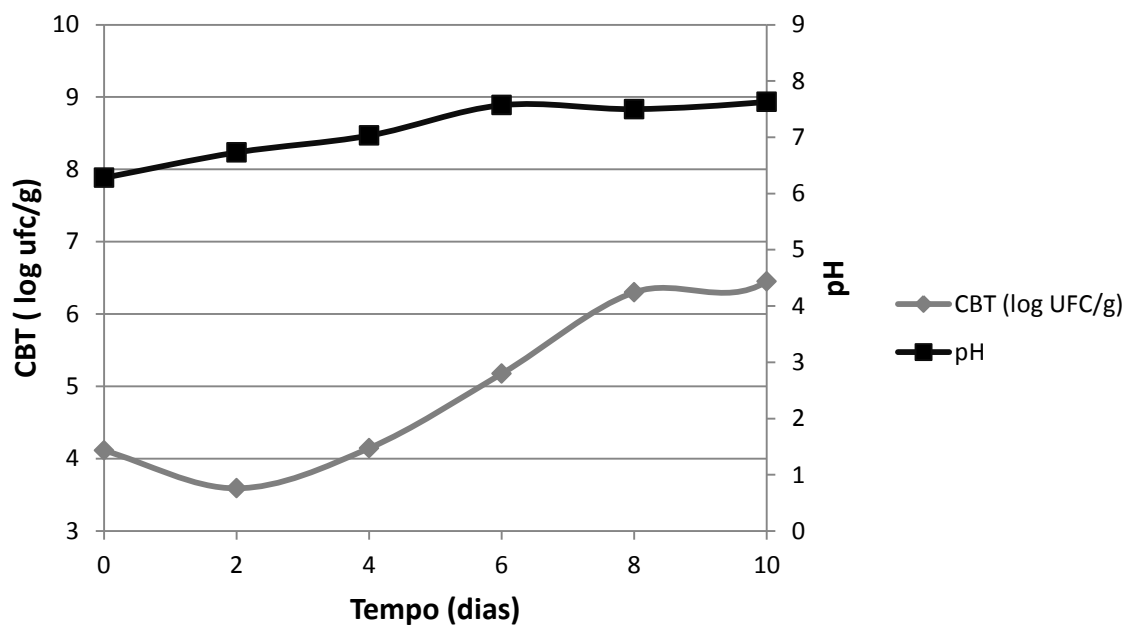


Figura 24. Gráfico degradação filé de peixe Tilápia sob refrigeração em 10 dias.

A definição dos parâmetros de coloração no tempo zero (L_0^* , a_0^* e b_0^*) para efeito comparativo do filme indicador foram medidas a partir do filé de peixe Tilápia embalado no filme plástico de polietileno no decorrer do período avaliado. Essas condições foram também aplicadas para o filme indicador ativado com antocianina encapsulada. A Figura 25 mostra a foto do filme controle e filme indicador.

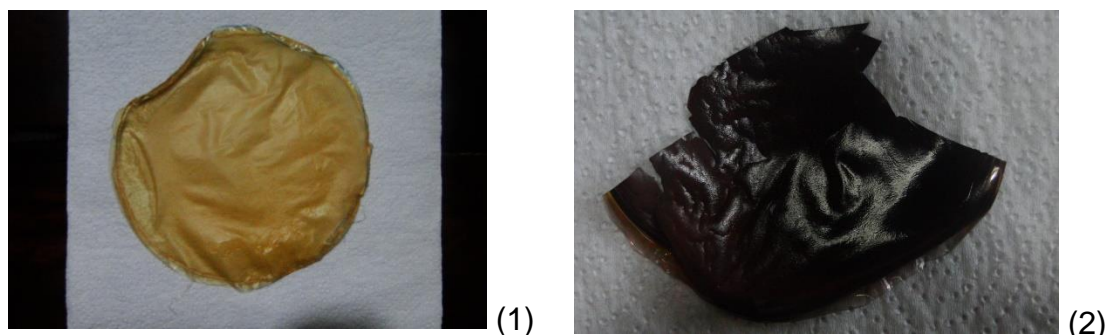


Figura 25. Fotos do filme controle (1) e do filme indicador (2)

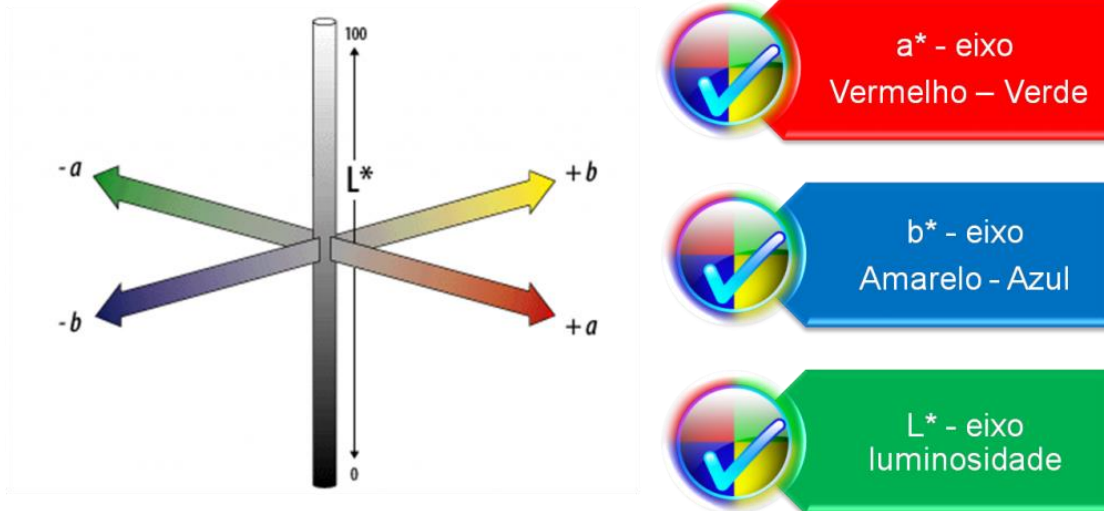
Após 4 dias de exposição sob refrigeração lê-se os valores obtidos na Tabela XVIII acompanhados da leitura do pH da carne do filé do peixe e contagem de colônias de microorganismos presentes no respectivo período.

Tabela XVIII. Parâmetros colorimétricos do filme indicador ativado e carne de peixe Tilápia após 5 dias de exposição com mudança de coloração total (ΔE)

<i>Parâmetros colorimétricos</i>						
Período (dias)	Sem filme	Contagem	L₀*	a₀*	b₀*	
	pH do peixe	UFC.g⁻¹				
1	5,55	1,80x10 ⁴	47,75 ± 7,62	18,68 ± 3,31	10,59 ± 2,35	
2	5,58	1,50x10 ⁴	48,73 ± 3,72	20,39 ± 2,97	13,67 ± 0,99	
3	5,67	1,00x10 ⁵	50,82 ± 2,37	16,73 ± 1,20	14,85 ± 1,31	
4	5,67	3,60x10 ⁵	55,61 ± 3,21	12,69 ± 2,86	14,39 ± 0,92	
5	5,61	9,00x10 ⁶	45,98 ± 1,68	15,57 ± 2,19	12,28 ± 1,03	
Período (dias)	Filme indicador	Contagem	L*	a*	b*	ΔE
	pH do peixe	UFC.g⁻¹				
1	5,52	1,30x10 ⁴	51,32 ± 1,28	21,54 ± 2,10	14,03 ± 3,26	5,72
2	5,59	3,90x10 ³	56,63 ± 3,68	19,92 ± 1,36	19,92 ± 1,36	8,12
3	5,66	1,40x10 ⁴	52,45 ± 3,28	19,79 ± 0,70	15,48 ± 0,51	3,96
4	5,67	1,50x10 ⁵	45,93 ± 1,71	18,50 ± 3,07	13,63 ± 1,22	11,31
5	5,58	2,00x10 ⁶	50,08 ± 3,76	19,92 ± 1,81	13,56 ± 0,90	6,11

A Tabela XVIII apresenta a média dos valores e desvios padrão dos parâmetros colorimétricos L*, a*, b*, bem como a variação de coloração total (ΔE) na escala CIELab (Esquema 25) para filmes indicadores, a variação de pH da carne de

peixe e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos desenvolvidos no período.



Esquema 25. Escala CIE Lab (Disponível em: < <http://sellerink.com.br/blog/tag/modelo-cielab> – Acesso em 08 dez. 2014>. Acesso em 11 jan. 2015)

O peixe apresenta uma degradação do tipo alcalina, ou seja, verifica-se um aumento do pH em função do tempo. Os resultados da Tabela XII demonstram que o filme indicador inibiu o crescimento bacteriano, pois ao final dos 5 dias a carne de peixe sem filme indicador apresentou $9,00 \times 10^6$ UFC enquanto que na presença do filme $2,00 \times 10^6$ UFC. Visto que trata-se de uma escala logarítmica agrega-se valor ao produto.

Segundo a RDC nº 12, de 2/01/2001 da ANVISA ¹²⁹ pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes "in natura", resfriados ou congelados não consumido cru são considerados próprios para consumo quando a amostra indicativa do alimento apresentar no máximo 10^3 UFC/g de estafilococcus coagulase-positiva. Essa resolução refere-se somente a um tipo de microorganismo, o *Staphylococcus aureus* enquanto que na presente pesquisa levou-se em consideração a contagem de UFC total sem discriminação por tipo de microorganismo.

Já a legislação internacional estabelece um máximo de 10^7 UFC/g para contagem total de bactérias mesófilas em músculo de pescado fresco ¹³⁰.

O valor de L^* (Tabela XIX) indica média transparência do material que é aumentada gradativamente nos 3 primeiros dias indicando clareamento do filme indicador e após diminuída até o quinto dia indicando escurecimento devido ao aumento do pH da carne do peixe de 5,52 para 5,67 e após diminuição do quarto para o quinto dia de 5,67 para 5,58 (Tabela XVIII). Essa alteração de coloração pode ser visualizada na Figura 26.



Figura 26. Filé de peixe tilápia com filme indicador aplicado na superfície (após 4 dias de exposição)

A intensidade de coloração medida pelo índice Croma (*C) apresenta uma diminuição gradativa no decorrer dos cinco dias conforme Tabela XIX indicando diminuição da intensidade da coloração do filme.

Tabela XIX. Parâmetros colorimétricos do filme indicador ativado após 5 dias de exposição com Índice Croma (*C)

Período (dias)	a^*	b^*	*C
1	21,54 ± 2,10	14,03 ± 3,26	25,70
2	19,92 ± 1,36	19,92 ± 1,36	25,22
3	19,79 ± 0,70	15,48 ± 0,51	23,64
4	18,50 ± 3,07	13,63 ± 1,22	22,97
5	19,92 ± 1,81	13,56 ± 0,90	20,64

Os valores de a^* e b^* variaram indicando que a cor do filme mudou em função do valor de pH. Um valor maior do parâmetro a^* acima de zero indica a tendência de coloração para o vermelho enquanto que o parâmetro b^* indica uma tendência de coloração amarela quando seus valores vão para zero e para azul para valores abaixo de zero ¹².

A variação dos valores de ambos parâmetros indica uma predominância do a^* em relação ao b^* , ou seja, do vermelho sobre o azul na faixa de pH de 5 a 6, faixa que o ensaio abrangeu.

A variação de coloração do filme indicador foi associada às diferentes estruturas químicas das moléculas do extrato de antocianina, as quais são dependentes da variação de pH quando em solução aquosa, ou de superfície hidratada como no caso do filé de peixe. Na faixa de pH de 1,0-3,0, antocianinas existem predominantemente na forma de cátion flavilium (cor vermelha) que contribui para o aparecimento de colorações violeta e vermelho. Na faixa de pH 2,0 - 4,0, as espécies quinoidais de coloração azul são predominantes. Aumentando o pH para 5,0 – 6,0 conduz a uma diminuição na intensidade da coloração e a concentração do cátion flavilium, que sofre hidratação para formação da pseudobase carbinol e chalcona, respectivamente ¹³.

A estrutura benzo-pirídica altamente conjugada é rompida devido ao ataque nucleofílico da água na posição 2 da estrutura da antocianidina. A rápida perda do próton do cátion flavilium acontece quando o pH aumenta. O equilíbrio é alterado para anidrobases quinoidais violeta em $\text{pH} < 7,0$ e um azul profundo da anidrobases ionizada em $\text{pH} < 8$. Quando o pH aumenta o rendimento da forma carbinol aumenta, através da abertura central do anel pirano, o amarelo claro da chalcona ¹³.

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos na presente pesquisa, o uso de extratos naturais encapsulados em sílica, torna-se uma potencial alternativa para conservação de alimentos. Dentre os extratos livres avaliados (urucum, cúrcuma, tanino, antocianina e extrato de oliva) urucum, tanino, antocianinas e extrato de oliva foram os que demonstraram melhor ação antimicrobiana contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Candida sp* e *Bacillus cereus aureus*.

Após encapsulamento em sílica, somente tanino e antocianina apresentaram resultados marcantes, até mesmo superiores aos dos extratos livres. Isso deve-se provavelmente à liberação controlada e gradativa dos bioativos através da rede de sílica conforme demonstrado no ensaio de lixiviação.

O tipo de rota sol-gel empregado afetou diretamente as características estruturais, morfológicas e texturais dos materiais encapsulados contendo os extratos naturais estudados. Dentre as rotas hidrolíticas avaliadas, a rota ácida foi a melhor alternativa para o encapsulamento do extrato contendo antocianinas e a rota básica, para o tanino. O material encapsulado com extrato contendo antocianinas, obtido via rota básica, e o com tanino obtido via rota ácida apresentaram ação antimicrobiana nula. Há evidências de alteração estrutural das antocianinas, pois em meio básico a banda de absorção em torno de 520 nm referente ao cátion flavílico é reduzida.

As características texturais e morfológicas também afetaram o desempenho dos materiais. Materiais encapsulados com áreas específicas maiores e superfícies mais lisas, mas com ranhuras contribuíram para maior interação com os bioativos em estudo e conseqüentemente maior desempenho quanto à ação antimicrobiana.

A ação antioxidante avaliada para o extrato contendo antocianina foi bastante satisfatória, porém esse resultado não foi observado quando testado alguns de seus respectivos materiais encapsulados. Isso pode ter ocorrido em função da cinética de reação com o radical ABTS utilizado no ensaio, visto que demonstra ser necessário que a total concentração do bioativo esteja disponível para ação, ao contrário da ação antimicrobiana que demonstrou que uma liberação gradual é mais efetiva.

O filme indicador avaliado demonstrou potencial como indicador de pH ao revelar mudança de coloração via colorímetro porém a olho nu a mudança não foi percebida claramente. Segundo os resultados de propriedades mecânicas, o mesmo torna-se mais propício para etiqueta indicadora do que filme para embalagem de alimentos, devido a sua rigidez, porém dotado de boa resistência à ruptura. Estudos mais aprofundados, como variação de concentração do material encapsulado na matriz polimérica e na proporção quitosana/PVA, fazem-se necessários para criação de um protótipo com real custo/benefício para o mercado, mas ao mesmo tempo demonstra perspectivas potenciais para investimento nessa aplicação para o desenvolvimento de embalagens ativas ou inteligentes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Ministério da Saúde. DTA – **Características gerais de sua distribuição no Brasil e no mundo. Disponível em:** < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11216-descricao-da-doenca>>. Acesso em 11 fev. 2015.
- 2 OKE, F. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, v. 112, p. 874-879, 2009.
- 3 DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009.
- 4 EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.
- 5 DEBEVERE, JOHAN; VERMEIREN, LIEVE; DEYLIEGHERE; FRANK. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**. v. 4, p. 273-285, 2004.
- 6 LÓPEZ-RUBIO, A.; ALMENAR, E.; HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; LAGARÓN, J. M.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Overview of active polymer-based packaging Technologies for food applications, **Food Review International**, v. 20(4) p. 357-387, 2004.
- 7 SOUZA, A. C.; DITCHFIELD, C.; TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In M. L. Passos, & C. P. Ribeiro (Eds), *Innovation in Food Engineering: New techniques and products*, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 511-537, 2010.
- 8 DAINELLI, Dario et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. S103-S112, 2008.
- 9 VEIGA-SANTOS P.; DITCHFIELD C.; TADINI C. Development and Evaluation of a Novel pH Indicator Biodegradable Film Based on Cassava Starch. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, p. 1069-1079, 2011.
- 10 KERRY, J. P; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle –based products: A review. **Meat Science**, v. 74, p. 113-130, 2006.
- 11 PACQUIT, Alexis et al. Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. **Food Chemistry**, v. 102, n. 2, p. 466-470, 2007.

- 12 PEREIRA Jr., Valdir Aniceto; ARRUDA, Natália Queiroz de; STEFANI; Ricardo. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in inteligente food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, n. 1, p. 180-188, Janeiro 2015.
- 13 YOSHIDA, Cristiana M.P. et al. Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. **LWT – Food Science and Technology**, v. 55, p. 83-89, 2014.
- 14 BRAGA, Lilian Rodrigues; PERES, Leila. Novas tendências em embalagens para alimentos: revisão. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment**, p. 69-84, 2010.
- 15 BRASIL. Portaria nº 42 de 14 de janeiro de 1998. SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/115381804745970b9f55df3fbc4c6735/POR_TARIA_42.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 6 jan. 2015.
- 16 SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 1766-1782, 2011.
- 17 LOPEZ-RUBIO, Amparo et al. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. **Food Reviews International**, v. 20, n. 4, p. 357-387, 2004.
- 18 HAN, J. H.; HO, C. H. L.; Rodrigues E. T. Intelligent packaging. In: HAN, J. H. (Ed.). Innovations in food packaging. Baltimore: Elsevier Science & Technology Books, 2005. cap. 9, p. 138-155.
- 19 20 DE KRUIJF, N. et al. Active end inteligente packaging: applications and regulatory aspects. **Food Additives & Contaminants**, v.19, p. 114-162, 2002.
- 20 ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Yuan. Preservation technologies for fresh meat–A review. **Meat science**, v. 86, n. 1, p. 119-128, 2010.
- 21 FORTIN, Corey et al. Consumer attitudes toward freshness indicators on perishable food products. **Journal of Food Distribution Research**, v. 40, n. 3, p. 1-15, 2009.
- 22 SMOLANDER, M. Freshness Indicators for packaging. **Food Science Technology**, v. 18, p. 26-27, 2004.
- 23 VANDERROOST, Mike et al. Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39 p. 47-62, 2014.
- 24 KUSWANDI, Bambang et al. Smart packaging: sensors for monitoring of food quality and safety. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 5, n. 3-4, p. 137-146, 2011.

- 25 TERCI, D. ROSSI A. Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução? *Química Nova*, v. 4, p. 684-688, 2002.
- 26 BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 14, de 28 de março de 2014. D.O.U. Seção I, nº 61, de 31 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e9e1c1004381c05e983bb935619547ef/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+14_2014_Mat%C3%A9rias+estranhas+em+alimentos.docx?MOD=AJPERES> Acesso em 06 jan. 2015.
- 27 KANIOU, I. et al. Determination of amine biogenics in fresh and unpacked and vacuum-packed beef during storage at 4°C. **Food Chemistry**, v. 74, p. 515-519, 2001.
- 28 SILVA-PEREIRA, Mayra Cristina et al. Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n.1, p. 258-262, 2015.
- 29 REALINI, CE; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, v. 98(3), p. 404-419, 2014.
- 30 AHVENAINEN, R. Novel Food Packaging Techniques. UK: Woodhead Publishing Cambridge, p. 11-12, 88-89, 108-113, 134-135, 536-541, 2003.
- 31 NUNES, M.L.; BATISTA, I. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. Lisboa: IPIMAR Divulgação, 2004.
- 32 SOARES, Karoline Mikaelle de Paiva; GONÇALVES, Alex Augusto. Qualidade e segurança do pescado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, v.71, n.1, p. 1-10, São Paulo, 2012.
- 33 ARVANITOYANNIS, Ioannis S.; KOTSAPOULOS, Konstantinos V. Migration phenomenon in food packaging. Food–package interactions, mechanisms, types of migrants, testing and relative legislation—a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 1, p. 21-36, 2014.
- 34 HEISING, J.K. et al. A non-destructive ammonium detection method as indicator for freshness for packed fish: Application on cod. *Journal of Food Engineering*, v.110(2), p. 254–261, 2012.
- 35 ZARAGOZÁ, Patricia Ana Fuentes et al. Development of a colorimetric sensor array for squid spoilage assessment. *Food Chemistry*, v. 175, p. 315–321, 2015.
- 36 AIDER, Mohammed. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 837-842, 2010.
- 37 KOLYBABA, M. et al. Biodegradable polymers: past, present, and future. In:**An ASAE Meeting Presentation**. 2003.

- 38 MACIEL, Vinícius BV; FRANCO, Telma T.; YOSHIDA, Cristiana MP. Sistemas inteligentes de embalagens utilizando filmes de quitosana como indicador colorimétrico de temperatura. **Polímeros**, v. 22, n. 4, p. 318-324, 2012.
- 39 LARANJEIRA, Mauro; FÁVERE, Valfredo T. de. Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- 40 DE SOUZA COSTA JR, Ezequiel; MANSUR, Herman Sander. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.
- 41 BRASIL, I. M. et al. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 39-45, 2012.
- 42 GUTIÉRREZ, Laura et al. Evaluation of Antimicrobial Active Packaging to Increase Shelf Life of Gluten-Free Sliced Bread. **Packaging Technology and Science**, v. 24, n. 8, p. 485-494, 2011.
- 43 GUTIERREZ, Jorge; BARRY-RYAN, Catherine; BOURKE, Paula. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.
- 44 CAMPANIELLO, D. et al. Chitosan: antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. **Food microbiology**, v. 25, n. 8, p. 992-1000, 2008.
- 45 EISSA, Hesham AA. Effect of chitosan coating on shelf-life and quality of fresh-cut mushroom. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, n. 1, 2008.
- 46 DI PIERRO, Prospero et al. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.
- 47 ANSORENA, María R.; MARCOVICH, Norma E.; ROURA, Sara I. Impact of edible coatings and mild heat shocks on quality of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L.) during refrigerated storage. **Postharvest biology and technology**, v. 59, n. 1, p. 53-63, 2011.
- 48 BELEWU, M. A. et al. Eucalyptus oil and lemon grass oil: effect on chemical composition and shelf-life of soft cheese. **Environment and Natural Resources Research**, v. 2, n. 1, p. p114, 2012.
- 49 PINTO, Maximiliano Soares et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International dairy journal**, v. 21, n. 2, p. 90-96, 2011.

- 50 BEVILACQUA, Antonio; CORBO, Maria Rosaria; SINIGAGLIA, Milena. Combined effects of modified atmosphere packaging and thymol for prolonging the shelf life of caprese salad. **Journal of Food Protection®**, v. 70, n. 3, p. 722-728, 2007.
- 51 DEL NOBILE, Matteo Alessandro et al. Strategies for prolonging the shelf life of minced beef patties. **Journal of food safety**, v. 29, n. 1, p. 14-25, 2009.
- 52 MASTROMATTEO, Marianna et al. Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 2, p. 250-256, 2010.
- 53 DE OLIVEIRA, Talita Moreira et al. Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. **Packaging Technology and Science**, v. 20, n. 2, p. 147-153, 2007.
- 54 AHMED, Ali M.; ISMAIL, Takwa H. Improvement of the quality and shelf-life of minced-beef mixed with soyprotein by Sage (*Salvia officinalis*). **Afr. J. Food Sci**, v. 4, p. 330-334, 2010.
- 55 JALOSINSKA, Małgorzata; WILCZAK, Jacek. Influence of plant extracts on the microbiological shelf life of meat products. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 59, n. 4, 2009.
- 56 UÇAK, İlknur; ÖZOGUL, Yesim; DURMUŞ, Mustafa. The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 6, p. 1157-1163, 2011.
- 57 BUSATTA, Cassiano et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, 2007.
- 58 BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.
- 59 FRANGOS, L. et al. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. **Food microbiology**, v. 27, n. 1, p. 115-121, 2010.
- 60 KOSTAKI, Maria et al. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. **Food microbiology**, v. 26, n. 5, p. 475-482, 2009.
- 61 PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. **Journal of applied microbiology**, v. 98, n. 4, p. 991-1000, 2005.
- 62 CISOWSKA, Agnieszka; WOJNICZ, Dorota; HENDRICH, Andrzej B. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. **Natural product communications**, v. 6, n. 1, p. 149-156, 2011.

63 DAGLIA, Maria. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

64 SHOHAYEB, M.; HAMEED, E. A.; BAZAID, S. Antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of *Conocarpus erectus* L. **Int. J. Pharm. Bio. Sci**, v. 3, p. 544-553, 2013.

65 BASNIWAL, Rupesh Kumar et al. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 5, p. 2056-2061, 2011.

66 VENUGOPALAN, Akshatha; GIRIDHAR, Parvatam. Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1879-S1882, 2012.

67 DEJONG, Sharon; LANARI, Maria Cecilia. Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. **Food chemistry**, v. 116, n. 4, p. 892-897, 2009.

68 BRASIL. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.

69 MERCOSUL. Resolução GMC n. 02/2012. Lista Positiva de Polímeros e Resinas para Embalagens e Equipamentos Plásticos em contato com Alimentos.

70 BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012. Publicado no D.O.U. em 21/11/2012. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Disponível em <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9ed8b1804d8b6c3daa51ebc116238c3b/ALIMENTOS+RESOLU%C3%87%C3%83O+RDC+n.+56,+DE+16+DE+NOVEMBRO+DE+2012.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 07 jan. 2015.

71 MERCOSUL. GMC/Res. nº 32/07. Regulamento Técnico Mercosul sobre a lista positiva de aditivos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Disponível em <
<http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/Res3207p.pdf>> Acesso em 07 jan. 2015.

72 BRASIL. Resolução - RDC nº 17/2008. Regulamento Técnico Mercosul sobre a lista positiva de aditivos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Disponível em <
http://abiplast.org.br/noticias/revisao-rdc-172008--lista-positiva-de-aditivos-com-as-restricoes-de-uso-limites-de-composicao-e-de-migracao-especifica-/20130712173036_O_504> Acesso em 07 jan. 2015.

73 MERCOSUL. GMC/Res. nº 15/10 Regulamento Técnico Mercosul sobre corantes em embalagens e equipamentos plásticos destinados a estar em contato com alimentos. Disponível em: <
http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/GMC_RES_2010-015_PT_RTM_Corantes.pdf> Acesso em 7 jan. 2015.

74 BRASIL. **Resolução-RDC nº 52, de 26 de novembro de 2010. Embalagens plásticas – Uso corantes – Regulamento.** Disponível em: <
<http://tributosdodistritofederal.com.br/index.php/content/view/15380.html>>. Acesso em 7 jan. 2015.

75 BRASIL. Resolução-RDC nº 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/11707300474597459fc3df3fbc4c6735/Resolu%C3%A7%C3%A3o+da+Diretoria+Colegiada++RDC+n++45+de+03+de+novembro+de+2010.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 6 jan. 2015.

76 BRASIL. Resolução CNNPA nº 44, de 1977. CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/29906780474588e892cdd63fbc4c6735/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 6 jan. 2015.

77 MULTON, Jean-Louis et al. Aditivos y Auxiliares de Fabricación em las industrias agroalimentarias. 2ª edición. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A, 2000.

78 GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric: chemistry, technology and quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 12, n. 3, p. 199-301, 1980.

79 APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 49, p. 163-169, 1995.

80 SILVA, L. V.; NELSON, D. L.; DRUMOND, M. F. B.; DUFOSSE, L.; GLORIA, M. B. A. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 1087-1096, 2005.

81 GUL, N.; MUJAHID, T. Y.; JEHAN, N.; AHMAD, S. Studies on the antibacterial effect of different fractions of *Curcuma longa* against urinary tract infection isolates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 12, p. 2055-2060, 2004.

82 SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P. M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, Bangalore, v. 83, n. 6, p. 737-740, 2002.

83 TÖNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, v. 76, p. 373-373, 1987.

- 84 NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, L.; RAO, J. M.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 4297-4300, 1999.
- 85 FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Specifications for identify and purity of food additives. Vol. II. Food Colors, 1963.
- 86 VILAR, Daniela de Araújo. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-8, 23 jun. 2014
- 87 VENUGOPALAN, Akshatha; GIRIDHAR, Parvatam. Mycoflora associated with seeds of *Bixa orellana* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p. 2091-2094, 2012.
- 88 BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.267-71, 2007.
- 89 MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos de azeites de oliva e de folhas de oliveira. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 537-548, out./dez. 2012.
- 90 BIANCO, Armandodoriano; RAMUNNO, Alessia. The chemistry of *Olea europaea*. **Studies in natural products chemistry**, v. 33, p. 859-903, 2006.
- 91 SILVA, S. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 5, p. 385-395, 2006.
- 92 GUINDA, Ángeles. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas y Aceites*, v. 57, n. 1, p. 165-170, 2006.
- 93 EDGECOMBE, Steven C.; STRETCH, Graham L.; HAYBALL, Peter J. Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 12, p. 2996-3002, 2000.
- 94 BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 457-462, 2000.
- 95 PEREIRA, Ana Paula et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, v. 12, n. 5, p. 1153-1162, 2007.
- 96 MELO, Maria J; PINA, Fernando; ANDARY, Claude. Anthocyanins: Nature's Glamorous Palette. In: BECHTOLD, Thomas; MUSSAK, Rita. *Handbook of Natural Colorants*. Chichester, U.K: Wiley, p. 135-150, 2009.
- 97 LOPES, Toni Jefferson et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.

- 98 CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, 113. p. 859-871, 2009.
- 99 COWAN, Marjorie Murphy. Plant products as antimicrobial agentes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.
- 100 CISOWSKA, Agnieszka; WOJNICZ, Dorota; HENDRICH, Andrzej B. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. **Natural product communications**, v. 6, n. 1, p. 149-156, 2011.
- 101 LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. et al. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Critical Reviews Food Science Nutrition*, v.40, n.3, p.173-289, 2000.
- 102 DIRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELDT. H., et al. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. **Food Chemistry**, v. 72, p.431-437, 2001.
- 103 BERNAYS, E. A.; DRIVER, G. C.; BILGENER, M. Herbivores and plant tannins. **Advana Ecology Research**, v. 19, p. 263-302, 1989.
- 104 HARBORNE, Jeffrey B. **The flavonoids advances in research since 1986**. CRC Press, 1993.
- 105 HASSANPOUR, Shahin et al. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion (IJFSE)**, v. 1, n. 1, p. 47-53, 2011.
- 106 QUEIROZ, Carla Regina Amorim dos Anjos; MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de NASCIMENTO, Evandro Afonso do. **Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*)**. *Rev. Árvore* [online], vol.26, n.4, pp. 493-497, 2002.
- 107 MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A. Studies on polyphenols of *Myracrodruon urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 447-452, 1999.
- 108 SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 21-40, 2001.
- 109 FRUTOS, Pilar et al. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 191-202, 2004.
- 110 CHUNG, K.-T. et al. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 29-32, 1993.
- 111 HARDING, Stephen E. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**. Nottingham: Nottingham University Press, v. 27, p. 316, 2010.

- 112 AVNIR, David et al. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. **Chemistry of Materials**, v. 6, n. 10, p. 1605-1614, 1994.
- 113 IUPAC- Goldbook. Sol-gel process. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org.br/ST07151.html>>. Acesso em: 6 jan. 2015.
- 114 SCHUBERT, Ulrich; HUSING, Nicola. Synthesis of Inorganic Materials. 2nd Edition. Vienna: Wiley-VCH, 2005.
- 115 BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The Sol-Gel Preparation of Silica Gels. *J. Chem. Educ.*, 71 (7), p. 599, July 1994.
- 116 SING, K. S. W.; *Adv. Colloid Interface Sci.*, p. 76-77, 1998.
- 117 BRINKER, C. Jeffrey; SCHERER, George W. Sol-gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing. San Diego: Academic Press, 1990.
- 118 NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- 119 RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.
- 120 AXELSEN, P. H., Essentials of antimicrobial pharmacology: a guide to fundamentals for practice. Human Press, p.193, 2002
- 121 BURNETT, G.W.; SCHUSTER, G.S. Microbiologia Oral e Enfermidade infecciosas. Panamericana, Buenos Aires, 1982.
- 122 NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. Oral Microbiology and Immunology. 2ª ed., . Philadelphia, Saunders, 1994.
- 123 SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. Mosby, p. 649, 1992.
- 124 CAVALCANTI, Rodrigo N.; SANTOS, Diego T.; MEIRELES, Maria Angela A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems— An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011.
- 125 Curran MD, Stiegman AE. Morphology and pore structure of silica xerogels made at low pH. **J Non-Cryst Solids**, v. 249, p.62–68, 1999.
- 126 HENCH, Larry L.; WEST, Jon K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33-72, 1990.
- 127 ARAÚJO, Emiliane Andrade et al. da Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.

128 LI, Hongyan et al. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. **Food research international**, v. 46, n. 1, p. 250-259, 2012.

129 BRASIL. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

130 FAO. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros: Documento técnico de pesca 334. Roma, 1997. 174p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/T1768S/T1768S00.HTM>>. Acesso em 11 jan. 2015