

GEANY PERUCH CAMILLOTO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE EMBALAGEM ATIVA  
INCORPORADA COM PRODUTO À BASE DE TRICLOSAN PARA  
APLICAÇÃO EM CARNE BOVINA

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da existência, pela proteção e pela presença divina em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do programa.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança, pela amizade e pela força nos momentos difíceis.

Aos professores Nélio José de Andrade e Miriam Fontes Araújo Silveira pelo aconselhamento e pela atenção.

À minha mãe, pelo imenso amor e carinho, pelos ensinamentos, pela preocupação, pelo incentivo, pela confiança, pela paciência, pelas palavras sábias e pelas orações que me confortaram nos momentos de fraqueza e tristeza, enfim, por tudo que fez pela minha felicidade e pelo meu crescimento profissional. Dedico esta conquista a você que me incentivou e de me deu força durante esta caminhada.

Ao meu pai, pelo amor, pelo carinho, pelo apoio, pela dedicação e pelo sacrifício em suas longas e cansativas viagens para realização do meu sonho.

À minha irmã, Geandra, pela amizade, pelos conselhos, pelas consultas e por ser a melhor irmã do mundo.

A toda minha família, pelo amor, pelo apoio, pela ajuda e pelo incentivo em todos os momentos.

Ao professor Vicente de Paula Lélis, pelas conversas, pela ajuda e pela oportunidade de ser monitora em sua disciplina.

Ao Paulo Rogério e à Cláudia Lúcia pela participação na banca e pelas preciosas sugestões.

À professora Edimar pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu namorado, André, pelo apoio e pela enorme paciência.

À Ana Clarissa, pela amizade e pelas dicas durante a realização do experimento.

À minha amiga, Marcinha, pela paciência e pela ajuda nas análises microbiológicas.

Ao Juninho, pela ajuda nas análises de cromatografia e pela companhia no laboratório durante as férias.

Às minhas estagiárias, Miriane, Ana Christina, Débora e Tatiana, pela preciosa ajuda.

À minha amiga Nádia, pela imensa ajuda nos momentos mais difíceis.

À Regiane, pela amizade e pelo apoio.

A toda equipe Laboratório de Embalagens, pela união e pela alegre convivência.

Às minhas amigas de república, Márcia, Marla, Carol e Anastácia, pelo companheirismo.

Aos funcionários do DTA, pela contribuição em vários momentos.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

GEANY PERUCH CAMILLOTO, filha de José Maria Camilloto e Martha Peruch Camilloto, nasceu em Ibirapu, Espírito Santo, em 10 de novembro de 1984.

Em maio de 2002, iniciou o Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em março de 2007.

Em março de 2007, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2009.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	VI
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1.....	3
DESENVOLVIMENTO DE FILMES ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS E DAS SUAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS .....	3
RESUMO .....	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	7
2.1. Produção dos filmes antimicrobianos.....	7
2.2. Análise das propriedades físico-mecânicas dos filmes .....	8
2.2.1 – Determinação da espessura dos filmes.....	8
2.2.2 – Avaliação das propriedades mecânicas dos filmes .....	8
2.2.3 – Determinação da taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) ....	9
2.2.4 – Determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO).....	9
2.3 – Avaliação das características microscópicas dos filmes .....	10
2.3.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	10
2.3.2 – Microscopia de força atômica (MFA) .....	10
2.4 – Análise estatística dos resultados .....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
4. CONCLUSÃO .....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2.....	24
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DO TRICLOSAN E DOS FILMES <i>IN VITRO</i> .....	24
RESUMO .....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.1. Produção dos filmes antimicrobianos.....	28
2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes <i>in vitro</i> .....	29

2.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	30
2.4 – Análise estatística dos resultados .....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4. CONCLUSÃO .....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO 3.....	43
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM CARNE BOVINA E DA DIFUSÃO DO TRICLOSAN DO FILME PARA O ALIMENTO	43
RESUMO .....	43
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	48
2.1. Produção dos filmes antimicrobianos.....	48
2.2. Obtenção da carne bovina .....	49
2.3. Acondicionamento e estocagem da carne bovina .....	49
2.4. Análises microbiológicas .....	51
2.5. Extração e quantificação do triclosan na carne bovina .....	51
2.4 – Análise estatística dos resultados .....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4. CONCLUSÃO .....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CONCLUSÃO GERAL .....	66
ANEXOS .....	67

## RESUMO

CAMILLOTO, Geany Peruch, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-orientadores: Nélio José de Andrade e Miriam Fontes Araújo Silveira.

A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa, capaz de eliminar ou inibir microrganismos deterioradores e patogênicos presentes nos alimentos. Este trabalho teve como objetivos: I) desenvolver filmes de polietileno de baixa densidade com diferentes concentrações de produto à base de triclosan; II) avaliar suas propriedades físicas e mecânicas e suas características microscópicas; III) avaliar sua eficiência antimicrobiana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria innocua*; IV) determinar a concentração mínima inibitória do produto à base de triclosan sobre os mesmos microrganismos e verificar a capacidade destes microrganismos de desenvolverem mecanismos de resistência, após sucessivas exposições ao produto à base de triclosan; V) avaliar a eficiência antimicrobiana e difusão do triclosan dos filmes em bifés de carne bovina. O processo de incorporação do produto à base de triclosan em polietileno de baixa densidade (PEBD) não foi totalmente eficiente, sendo que, aproximadamente, 36% do composto adicionado foi incorporado. A presença de triclosan nos filmes não alterou a espessura, as propriedades mecânicas dos filmes (carga máxima ruptura, porcentagem de alongamento na ruptura e módulo de elasticidade), a taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) e a taxa de transmissão ao oxigênio (TTO). Nas fotomicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia de força atômica (MFA) observou-se que os filmes com ou sem triclosan eram homogêneos, sugerindo que o triclosan é muito miscível no polímero de polietileno de baixa densidade, o que pode ser explicado pela interação favorável entre o antimicrobiano e o polímero. Os

filmes que continham triclosan apresentaram eficiência antimicrobiana *in vitro* sobre *E. coli* e *S. aureus*, com formação de halos de inibição, sendo que com o aumento da concentração de produto à base de triclosan no filme, maior foi o diâmetro do halo encontrado. Não houve formação de halo de inibição para *L. innocua*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*, no entanto, ocorreu pequena redução da densidade das colônias ao redor dos filmes com diferentes concentrações do antimicrobiano para *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*. Após sucessivas exposições subletais ao produto à base de triclosan, *E. coli* e *S. aureus* apresentaram maior concentração mínima inibitória de triclosan, o que sugere que estas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a este antimicrobiano. Os filmes com triclosan não apresentaram atividade sobre bactérias lácticas, enterobactérias e de *Pseudomonas* sp. na carne durante o período de estocagem comparados com o filme controle. Houve efeito dos filmes antimicrobianos sobre de psicotróficos, sendo que o filme do tratamento com 3% de triclosan apresentou menor contagem de psicotróficos até o 5<sup>o</sup> dia de estocagem da carne e os filmes dos tratamentos com 1% e 2% de triclosan inibiram o crescimento destes microrganismos apenas até o 3<sup>o</sup> dia. A difusão do triclosan dos filmes com 3% de triclosan para a carne embalada em bandejas de poliestireno ultrapassou o limite estabelecido pela Comunidade Européia após o 6<sup>o</sup> dia de estocagem da carne em contato com o filme do tratamento. Para os demais tratamentos, a concentração máxima de triclosan detectada na carne foi inferior ao limite permitido. Os filmes incorporados com triclosan apresentaram comportamento típico de embalagem ativa com difusão do antimicrobiano de maneira controlada para o alimento. Portanto, os filmes possuem potencial de aplicação como embalagens de alimentos em relação as suas características antimicrobianas e mecânicas, podendo aumentar a vida de prateleira dos alimentos e auxiliar na garantia da segurança alimentar. A eficiência do filmes em carne bovina pode ter sido afetada pela baixa qualidade matéria-prima.

## ABSTRACT

CAMILLOTO, Geany Peruch, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Development and evaluation of active packaging incorporated with triclosan based product for meat application.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-Advisers: Nélio José de Andrade and Miriam Fontes Araújo Silveira.

The antimicrobial packaging is a promising type of active packaging able to eliminate or inhibit spoilage and pathogens microorganisms in food. This study aimed to: i) develop films of low density polyethylene with different concentrations of triclosan based product; II) evaluate the physical and mechanical properties and microscopic characteristics of the films; III) evaluate the *in vitro* antimicrobial efficiency against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria innocua*; IV) evaluate the effect of successive exposures to triclosan based product on different microorganisms; V) evaluate the antimicrobial effectiveness of triclosan and the diffusion of the triclosan from the films to the meat. The incorporation process of triclosan based product in low-density polyethylene (LDPE) was not fully effective, only 36% of added compound was incorporated. The presence of triclosan in the films did not change the thickness, the mechanical properties of films (maximum load at break, percent elongation at break elastic modulus), the water vapor transmission rate (WVT) and the oxygen transmission rate. The antimicrobial incorporation did not affect the polymeric structure of the films, suggesting that triclosan is very miscible in the polymer of low-density polyethylene, which may be explained by favorable interaction between the antimicrobial and the polymer. The films containing triclosan showed *in vitro* antimicrobial efficiency on *E. coli* and *S. aureus* inoculated on agar surfaces. The increasing concentration of triclosan in the film increased the diameter of the inhibition halo. There was no formation of inhibition halo for *L. innocua*, *S. choleraesuis* and *P. aeruginosa*. However, there was a small reduction in colonies density around the films on *S. choleraesuis* and *P. aeruginosa*. After

successive sublethal exposure to triclosan based product, both *E. coli* and *S. aureus* increased the triclosan minimal inhibitory concentration suggesting that these bacteria develop mechanisms of resistance to triclosan. The films with triclosan did not reduce the count of lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* sp. in meat during storage when compared with the control film. There was an effect of the antimicrobial films against psychrotrophic bacteria. The film treated with 3% triclosan showed lower counts of psychrotrophic until the 5<sup>th</sup> day of storage of meat, and the films treated with 1% and 2% triclosan inhibited growth of these microorganisms until the 3<sup>rd</sup> day. The diffusion of triclosan from the films for the meat in contact with the film obtained by treatment with 3% of triclosan and packed in polystyrene trays was higher than the limit allowed by the Scientific Committee for Food at 6<sup>th</sup> day of storage. In the other treatments, the maximum concentration of triclosan found in meat was lower than the permitted limit. The films incorporated with triclosan based product showed typical behavior of active packaging with controlled antimicrobial diffusion for the food. Therefore, the films have potential application as packaging for food for their antimicrobial and mechanical characteristics and can increase the shelf life and ensure the safety of foods. The efficiency of the films in beef may have been affected by low quality raw material.

## INTRODUÇÃO

A carne é um alimento rico em nutrientes de grande importância na dieta humana. No entanto, é um alimento altamente perecível por ser ambiente favorável para crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos. A contaminação microbiana pode representar um risco à saúde do consumidor e reduzir a vida de prateleira do produto. Os açougues representam um importante ponto de contaminação devido às más condições higiênicas do ambiente, superfícies, manipuladores, equipamentos e utensílios.

Atualmente, a provisão de alimentos seguros é de grande importância para atender a demanda dos consumidores que estão cada vez mais preocupados com a higiene e segurança dos alimentos, buscando produtos de qualidade, nutritivos, mais próximos ao natural, convenientes, seguros e com maior vida de prateleira. Para alcançar todas essas exigências, o uso de embalagem que possa interagir diretamente com o produto alimentício, no sentido de modificar aspectos desejáveis para a melhoria da qualidade do produto embalado tem sido sugerido nas últimas décadas. Essas embalagens são denominadas embalagens ativas e, como exemplos, podem ser citados os filmes antimicrobianos, filmes antioxidantes, sachês absorvedores de etileno, de oxigênio, de umidade e indicadores de controle de temperatura. A tecnologia de controlar microrganismos indesejáveis por meio da incorporação ou imobilização de substâncias antimicrobianas em superfícies das embalagens tem recebido atenção em vários países e pesquisas têm sido realizadas em produtos de laticínios, utensílios de cozinha, filtros de tratamento de água e materiais de embalagem.

O uso de embalagens ativas contendo agentes antimicrobianos visa eliminar ou reduzir o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos, de forma a aumentar a vida de prateleira dos alimentos e garantir a segurança dos consumidores. Estas embalagens têm como vantagem a liberação controlada do antimicrobiano, estando este, portanto, em menores concentrações no alimento e inibindo o crescimento microbiano na superfície

dos alimentos, que é uma das principais causas de deterioração e perdas de produtos processados e *in natura*.

Vários compostos podem ser incorporados em embalagens, dentre eles o triclosan. Esse composto vem se destacando devido ao seu amplo espectro de ação, sendo efetivo na inibição do crescimento de vários microrganismos. Além disso, apresenta estabilidade térmica podendo ser incorporado em polímeros que são transformados durante o processo de extrusão.

Nesse contexto, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: I) desenvolver filmes de polietileno de baixa densidade com diferentes concentrações de produto à base de triclosan; II) avaliar suas propriedades físicas e mecânicas e suas características microscópicas; III) avaliar sua eficiência antimicrobiana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria innocua*; IV) determinar a concentração mínima inibitória do produto à base de triclosan para os mesmos microrganismos e verificar a capacidade de diferentes microrganismos desenvolver mecanismos de resistência após sucessivas exposições ao produto à base de triclosan; V) avaliar a eficiência antimicrobiana e difusão do triclosan dos filmes em bifés de carne bovina.

## **CAPÍTULO 1**

### **DESENVOLVIMENTO DE FILMES ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DAS SUAS PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS E DAS SUAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS**

#### **RESUMO**

Foram desenvolvidos filmes antimicrobianos de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporados com diferentes concentrações de produto à base de triclosan. Avaliaram-se as propriedades físicas e mecânicas e as características microscópicas dos filmes. As concentrações do produto em estudo (1%, 2% e 3%) não foi totalmente incorporada aos resinas de polietileno de baixa densidade. A espessura, as propriedades mecânicas dos filmes como carga máxima na ruptura, porcentagem de alongamento na ruptura e módulo de elasticidade, a taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) e ao oxigênio (TTO) dos filmes não variaram ( $p > 0,05$ ) em função dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan. Nas fotomicrografias dos filmes antimicrobianos obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia de força atômica (MFA) observou-se que o filme sem triclosan é completamente homogêneo, e em filmes contendo triclosan a homogeneidade foi pouco alterada, o que sugeriu que o triclosan é muito miscível no polímero de PEBD, o que pode ser explicado pela interação favorável entre o antimicrobiano e o polímero.

#### **1. INTRODUÇÃO**

As embalagens têm tradicionalmente a função de proteger os alimentos das condições externas e garantir mínima interação com o produto. Assim, as

embalagens apresentam limitações para prolongar a vida útil dos alimentos. Recentemente, diversos sistemas de embalagens foram desenvolvidos com o objetivo de corrigir deficiências das embalagens passivas, bem como atender às tendências de mercado e à crescente demanda dos consumidores por alimentos mais seguros, saudáveis, práticos e “mais próximos” ao natural. A embalagem ativa é um conceito inovador definida como a embalagem que interage, de forma desejável, com o alimento, com o objetivo de estender sua vida de prateleira ou de melhorar suas características sensoriais e de segurança, mantendo sua qualidade (ROONEY, 1995; VERMEIREN et al., 1999; VERMEIREN et al., 2002).

Nos Estados Unidos, Japão e Austrália os sistemas de embalagens ativas vêm sendo aplicados com sucesso para a manutenção da qualidade e segurança dos alimentos. Entretanto, na Europa, o desenvolvimento e a aplicação desse tipo de embalagem são ainda limitados em função das restrições da legislação, resistência do consumidor, necessidade de conhecimento sobre a efetividade, impacto econômico e ambiental (VERMEIREN et al., 1999, AHVENAINEN, 2003).

Existem diversos tipos de embalagens ativas, como os absorvedores de oxigênio, absorvedores de etileno, absorvedores de umidade, liberadores de antioxidantes, liberadores e, ou absorvedores de aromas e embalagens antimicrobianas (VERMEIREN et al., 1999).

A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa capaz de eliminar ou inibir microrganismos deterioradores e patogênicos presentes nos alimentos. A função antimicrobiana é adquirida pela adição de agentes no material da embalagem com o objetivo de limitar ou prevenir o crescimento microbiano, com o aumento da fase lag e redução da taxa de crescimento do microrganismo alvo (HAN, 2000).

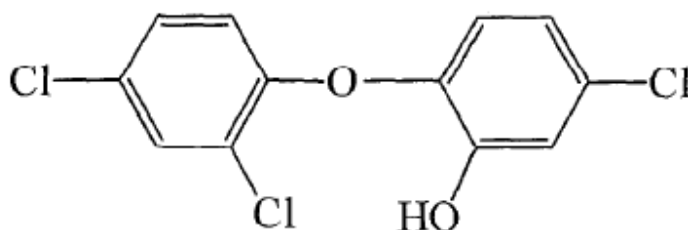
A ação antimicrobiana da embalagem no produto pode ocorrer por processos de liberação, absorção ou imobilização do composto antimicrobiano. O sistema de liberação permite a difusão do agente antimicrobiano para o alimento ou para o interior de embalagens, enquanto o processo de absorção

remove fatores essenciais, como o oxigênio, inibindo o crescimento de microrganismos. O sistema de imobilização não libera o agente antimicrobiano, mas inibe o crescimento dos microrganismos na superfície de contato da embalagem com o alimento (HAN, 2003).

As embalagens antimicrobianas são elaboradas, principalmente, pela adição do composto antimicrobiano no processo de extrusão da resina durante a produção do filme. A incorporação de aditivos antimicrobianos em filmes plásticos durante a extrusão depende da estabilidade térmica dos aditivos e da não-volatilidade nas condições do processo, e ainda da pressão e da força de cisalhamento a que são submetidos durante a extrusão (BRODY et al., 2001; COMA, 2008). Portanto, a escolha do agente antimicrobiano é de extrema importância durante o processo de fabricação do filme. Para a obtenção de uma embalagem ativa antimicrobiana devem ser considerados outros fatores, como a natureza química, a concentração, as propriedades sensorial e o mecanismo de ação do agente antimicrobiano incorporado; as características físico-químicas do alimento; a microbiota do alimento e a fisiologia do microrganismo alvo; a cinética de difusão do agente antimicrobiano para o alimento; o ambiente de estocagem; o processo de fabricação do material da embalagem; o efeito da espessura do material na sua atividade antimicrobiana; o efeito do antimicrobiano nas propriedades físicas e mecânicas da embalagem e aspectos relacionados à legislação e à toxicidade do antimicrobiano (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002; HAN, 2002).

Vários compostos naturais e sintéticos foram testados para o uso em diferentes materiais de embalagens de alimentos como plásticos, fibras têxteis e papel, incluindo ácidos orgânicos (HAN e FLOROS, 1997; DEVLIEGHRE, et al., 2000) e seus respectivos ácidos anidros (WENG e CHEN, 1997), bacteriocinas (MING et al., 1997; SIRAGUSA et al., 1999, PIRES et al., 2008; SANTIAGO-SILVA et al., 2009), enzimas (APPENDINI e HOTCHKISS, 1997), imazalil (WENG e HOTCHKISS, 1992) e compostos orgânicos (CUTTER, 1999; VERMEIREN et al., 2002).

Dentre os compostos orgânicos, os bifenóis pertencem a uma classe de compostos que apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana. Uma das substâncias mais utilizadas é o triclosan (2,4,4'-triclouro-2'-hidroxidifenil-eter) (Figura 1), um composto sintético, não-iônico e de amplo espectro antimicrobiano (BHARGAVA e LEONARD, 1996; SCHWEIZER, 2001).



Fonte: BHARGAVA e LEONARD (1996).

Figura 1 - Estrutura molecular do 2,4,4'-triclouro-2'-hidroxidifenil-eter.

O triclosan é efetivamente utilizado em produtos de higiene pessoal, como pasta de dente, enxaguante bucal, desodorante, sabonete, dentre outros, por mais de 20 anos. Compostos à base de triclosan são amplamente incorporados em polímeros, como polietileno, polipropileno, poli(cloreto de vinila), para fabricação de escovas de dente, tábuas de carne, cabo de facas para uso industrial, bem como em produtos hospitalares como luvas e aventais cirúrgicos. A incorporação do triclosan em polímeros é possível considerando a estabilidade térmica desse composto, que pode ser aquecido a 200 °C, por 2 horas, sem que perca sua eficiência antimicrobiana (SCHWEIZER, 2001; COMA, 2008).

O uso de triclosan para contato com alimentos foi aprovado pelo Scientific Committee for Food (SCF), da Comunidade Européia, com o limite de 5 mg/kg de alimento (SCF, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver filmes antimicrobianos de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporados com produto à base de triclosan e avaliar suas características microscópicas e suas propriedades físicas e mecânicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das análises físicas, mecânicas e microscópicas, foram produzidos filmes incorporados com diferentes concentrações de produto à base de triclosan. Os filmes foram produzidos no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

### 2.1. Produção dos filmes antimicrobianos

Os filmes antimicrobianos foram produzidos por meio da extrusão de uma mistura de resinas de polietileno de baixa densidade (85%) com polietileno de alta densidade com alta capacidade de absorção (15%) (Accurel XP200), previamente incorporada com produto à base de triclosan. A relação da concentração das resinas foi determinada previamente por meio de testes preliminares.

A mistura de resinas foi submetida a três tratamentos com concentrações de 1%, 2% e 3% de produto à base de triclosan em relação ao peso da mistura e, ainda, foi produzido um filme controle sem adição de antimicrobiano. As concentrações foram baseadas na quantidade limite de difusão do triclosan para o alimentos ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e em testes preliminares de extrusão com diferentes níveis de triclosan. Para a incorporação do antimicrobiano, a mistura dos polímeros com triclosan foi colocada em um balão de fundo chato contendo metiletilcetona, acoplado a um condensador, e mantida em banho-maria a  $90 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante duas horas. Posteriormente, a mistura foi filtrada em papel de filtro e deixada em repouso até a completa evaporação do solvente. A resina, sem triclosan, também foi submetida ao mesmo processo.

A quantidade do antimicrobiano incorporada na mistura de resinas foi determinada por meio de um balanço de massa. Inicialmente, determinou-se a quantidade de polietileno perdido em função do processo de aquecimento da

resina com o solvente. Para tal, a mistura de resina, sem adição do produto à base de triclosan, foi submetida ao mesmo processo utilizado para a incorporação do antimicrobiano. O resíduo de polietileno perdido foi calculado pela diferença entre o peso da resina antes e após o processo de incorporação. Para o cálculo do antimicrobiano incorporado, subtraiu-se a quantidade de triclosan adicionada da não incorporada, sendo que esta foi determinada subtraindo-se do peso da resina incorporada, o peso de resina mais triclosan adicionados e o peso do resíduo de polietileno perdido durante o processo.

O processo de extrusão foi realizado em uma extrusora mono-rosca (Thermo, modelo HAAKE POLYDRIVE R600/610), equipada com cinco zonas de aquecimento, cujas temperaturas foram mantidas a 130 °C, 140 °C, 150 °C, 160 °C e 170 °C da zona de alimentação à saída da matriz. Utilizou-se uma matriz tubular e a rotação da rosca foi de 30 rpm.

## **2.2. Análise das propriedades físico-mecânicas dos filmes**

### **2.2.1 – Determinação da espessura dos filmes**

A espessura média dos filmes foi medida com o auxílio de um micrômetro da marca Mitutoyo. Foram retiradas quatro amostras de cada filme, tomando-se as medidas em dez pontos diferentes em cada amostra, com um total de 40 medidas de cada filme. As medidas de espessura foram expressas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

### **2.2.2 – Avaliação das propriedades mecânicas dos filmes**

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando-se o Aparelho Universal de Teste Instron, modelo 3367, com célula de carga de 1kN, velocidade e distância de separação entre as garras de  $500 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  e 50

mm, respectivamente. Para cada filme, foram analisadas cinco amostras com dimensões de 25 mm x 100 mm (ASTM, 2002).

### **2.2.3 – Determinação da taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA)**

A taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, segundo a metodologia ASTM E 96-00 (ASTM, 2000), com algumas modificações. Utilizaram-se cápsulas circulares ( $\varnothing = 82,3$  mm), com paredes impermeáveis, contendo 30 g de cloreto de cálcio anidro, granulometria entre 600  $\mu\text{m}$  e 2,36 mm. Os filmes foram vedados na junção filme/cápsula com auxílio de parafina. Após a montagem das cápsulas, estas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio em seu interior, de forma a manter a umidade relativa de 75 %. Por meio de pesagens diárias até peso constante, avaliou-se o ganho de peso associado à umidade permeada pelo filme. Os dados de ganho de peso e tempo foram representados em gráfico e, a partir do período em que os pontos formaram uma reta, foi calculado o ganho de peso por dia, sendo então convertida para a unidade relativa à taxa de transmissão ao vapor de água ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ ).

### **2.2.4 – Determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO)**

Para a determinação da taxa de transmissão ao oxigênio (TTO), amostras dos diferentes filmes foram cortadas e seladas, obtendo-se sacos com 1016  $\text{cm}^2$  de área considerando-se ambas as faces. Os sacos foram rinsados com nitrogênio a fim de obter uma baixa concentração inicial de oxigênio. Posteriormente, os sacos foram preenchidos com nitrogênio e, foram feitas medições diárias da porcentagem de oxigênio no interior dos sacos em um analisador de oxigênio (Illinois instruments, modelo 6600). A temperatura e

a umidade relativa do ambiente em que os sacos foram armazenados foram registradas diariamente. Os dados de ganho de oxigênio em função do tempo foram representados em gráfico e, o período em que os pontos formaram uma reta, foi calculado o ganho de oxigênio por dia, sendo então convertida para a unidade relativa à taxa de transmissão ao oxigênio ( $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ ).

## **2.3 – Avaliação das características microscópicas dos filmes**

### **2.3.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As fotomicrografias dos filmes foram feitas, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa.

Dois cupons de cada filme foram cortados e fixados no suporte de porta-amostras do microscópio (*stub*), com auxílio de fita dupla-face. Em cada *stub*, foram fixados dois cupons de cada tratamento, um de forma longitudinal e outro de forma transversal. As amostras foram cobertas com 20 nm de ouro em Metalizador Balzers FDU 010 e, então, observadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura LEO 1430 VP, com aumentos de 500 X, 1000 X e 2000 X.

### **2.3.2 – Microscopia de força atômica (MFA)**

A microtopografia da superfície dos diferentes filmes foi avaliada utilizando-se microscopia de força atômica (MFA) no laboratório do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

Amostras dos filmes foram cortadas e fixadas no suporte de porta amostras do microscópio, com auxílio de fita dupla-face. Em seguida, cada amostra foi analisada no Microscópio de Força Atômica NT-MDT, utilizando-se

modo de contato intermitente. Para cada filme, foram realizadas varreduras de 50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ , onde se determinaram a rugosidade média e a rugosidade quadrática dos filmes, expressas em nanômetros (nm).

#### **2.4 – Análise estatística dos resultados**

Os experimentos foram realizados em 3 repetições no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram analisados por meio de Análise de Variância ao nível de 5% de probabilidade e análise de regressão, ao nível de 1% de probabilidade, com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1. A avaliação das fotomicrografias foi realizada por meio de análise descritiva.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as porcentagens de produto à base de triclosan adicionadas à mistura de resinas e as porcentagens incorporadas na mistura. A porcentagem incorporada equivale à concentração final do antimicrobiano nos filmes dos diferentes tratamentos.

Tabela 1 – Porcentagem de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas.

Tratamento	% adicionada na mistura	% presente nos filmes
A	0	0
B	1	0,460 ± 0,065
C	2	0,826 ± 0,075
D	3	1,080 ± 0,059

Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na porcentagem de produto à base de triclosan incorporada da mistura de resinas. Na Figura 2 está ilustrado a variação da concentração de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas. Observou-se que a concentração de produto à base de triclosan incorporada aumentou, de forma constante, em função da quantidade do antimicrobiano adicionada. Estima-se que, apenas 36% da quantidade de triclosan adicionada foi incorporada nas resinas e, portanto, está presente no filme.

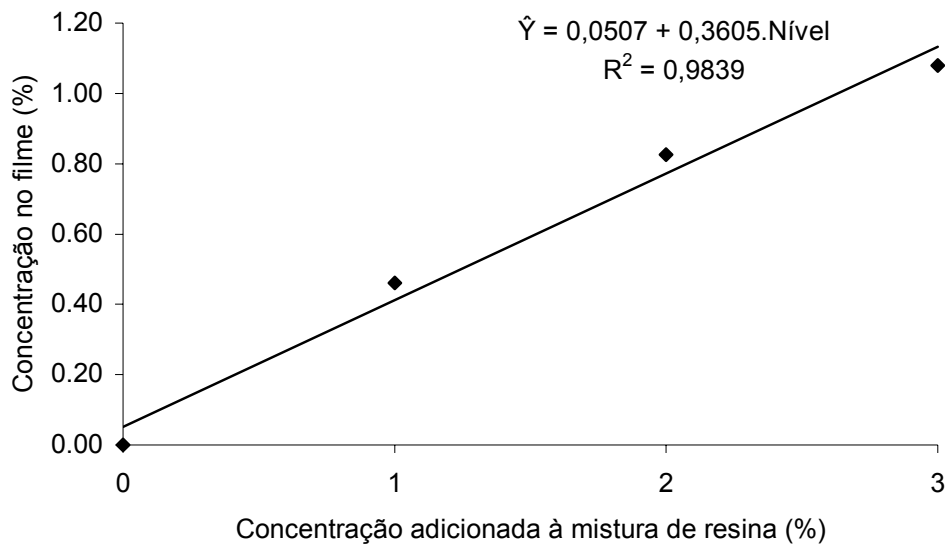


Figura 2 – Variação da concentração de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas.

A espessura dos filmes não variou ( $p > 0,05$ ) em função dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan, sendo a espessura média dos filmes de  $44,29 \pm 2,60 \mu\text{m}$ . O desvio padrão relativamente alto é associado ao processo de extrusão tubular em que ocorre variação da espessura em função de pequena variação na quantidade do ar injetado.

Os tratamentos com diferentes concentrações de triclosan também não influenciaram ( $p > 0,05$ ) nas propriedades mecânicas dos filmes (carga máxima na ruptura, porcentagem de alongamento na ruptura e módulo de elasticidade). Os valores médios das características mecânicas encontradas para os filmes foram de  $22,02 \pm 1,53 \text{ N}$ ,  $1380,11 \pm 188,89\%$  e  $1,52 \pm 0,37 \text{ MPa}$  para carga máxima na ruptura, porcentagem de alongamento na ruptura e módulo de elasticidade, respectivamente. Wurlitzer (2007) ao avaliar as características de filmes de poli(cloreto de vinilideno) (PVdC), adicionados de triclosan e ácido sórbico, também não observou mudança na porcentagem de alongamento na ruptura entre os filmes adicionados dos antimicrobianos e o filme controle. Entretanto, os filmes adicionados dos antimicrobianos levaram à redução da

carga máxima na ruptura comparado ao controle. Segundo o autor, os antimicrobianos aparentemente ocupam espaços e criam pontos de *stress* na estrutura do polímero, o que reduz a resistência à tração.

Os filmes de polietileno de baixa densidade produzidos sem adição de triclosan apresentaram baixa TTVA e esta propriedade não foi alterada pela adição de triclosan ( $p > 0,05$ ). Os filmes apresentaram valores médios de TTVA de  $6,49 \pm 0,65 \text{ g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ . Segundo Coutinho et al. (2003), a permeabilidade ao vapor de água de PEBD é baixa comparada à de outros polímeros, o que se deve a sua natureza apolar. Wurlitzer (2007) também não observou diferença na TTVA entre filmes de PVdC com e sem adição de triclosan. De acordo com esse autor, a TTVA do filme de PVdC é baixa por este ser uma matriz apolar e esta propriedade não é alterada pela adição de triclosan que também tem característica apolar.

O controle da quantidade de oxigênio presente em uma embalagem é de fundamental importância para a vida de prateleira de muitos produtos alimentícios, o que torna a taxa de transmissão ao oxigênio uma característica importante dos materiais flexíveis com propriedade de barreira (PERTTERSEN et al., 2004). A taxa de transmissão ao oxigênio (TTO) dos filmes não variou ( $p > 0,05$ ) em função das diferentes concentrações de triclosan, sendo que os filmes com espessura média de  $44,29 \mu\text{m}$  apresentaram valores médios de TTO de  $1469,74 \pm 82,51 \text{ cm}^3.\text{m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ . Roversi e Masson (2004) relataram uma taxa de transmissão ao oxigênio média de  $2844 \text{ cm}^3(\text{CNTP}).\text{m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$  para filmes de PEBD com espessura média de  $60 \mu\text{m}$ . Apesar da menor espessura dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan, estes apresentaram menor TTO do que a relatada por Roversi e Masson (2004) para filmes de mesmo polímero.

Segundo Crippa (2006), são numerosos os fatores que exercem influência sobre a permeabilidade ao oxigênio dos filmes plásticos, sendo importante ressaltar as características do material de barreira empregado, por exemplo, grau de cristalinidade, densidade, polaridade e simetria; os aditivos a ele incorporados durante a transformação como plastificantes, pigmentos e teor

de cargas; as características da transformação como orientação e velocidade de resfriamento; o processamento do filme e sua esterilização; a estrutura do filme; os tratamentos a que o filme é submetido como irradiação, revestimento, metalização e as condições de armazenamento como temperatura, umidade e pressão.

As fotomicrografias dos filmes antimicrobianos obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram observar a topografia da superfície e de cortes transversais dos filmes (Figuras 3 e 4). Nas fotomicrografias constatou-se que o filme sem triclosan é completamente homogêneo, enquanto nos filmes contendo triclosan a homogeneidade foi pouco alterada. Provavelmente, o triclosan é muito miscível no polímero de PEBD o que pode ser explicado pela interação favorável entre o antimicrobiano e o polímero. Essa interação não modificou a estrutura do polímero, o que justifica a manutenção das características mecânicas do polímero com a adição de triclosan. Resultados semelhantes foram obtidos por Wurlitzer (2007) com filmes de PVdC adicionados de triclosan e ácido sórbico. Nas fotomicrografias observou-se que os filmes que continham ácido sórbico provocaram a descontinuidade na rede polimérica, o que não ocorreu com os filmes adicionados de triclosan, que em função da interação favorável entre o antimicrobiano e o polímero não modificaram a estrutura do filme.

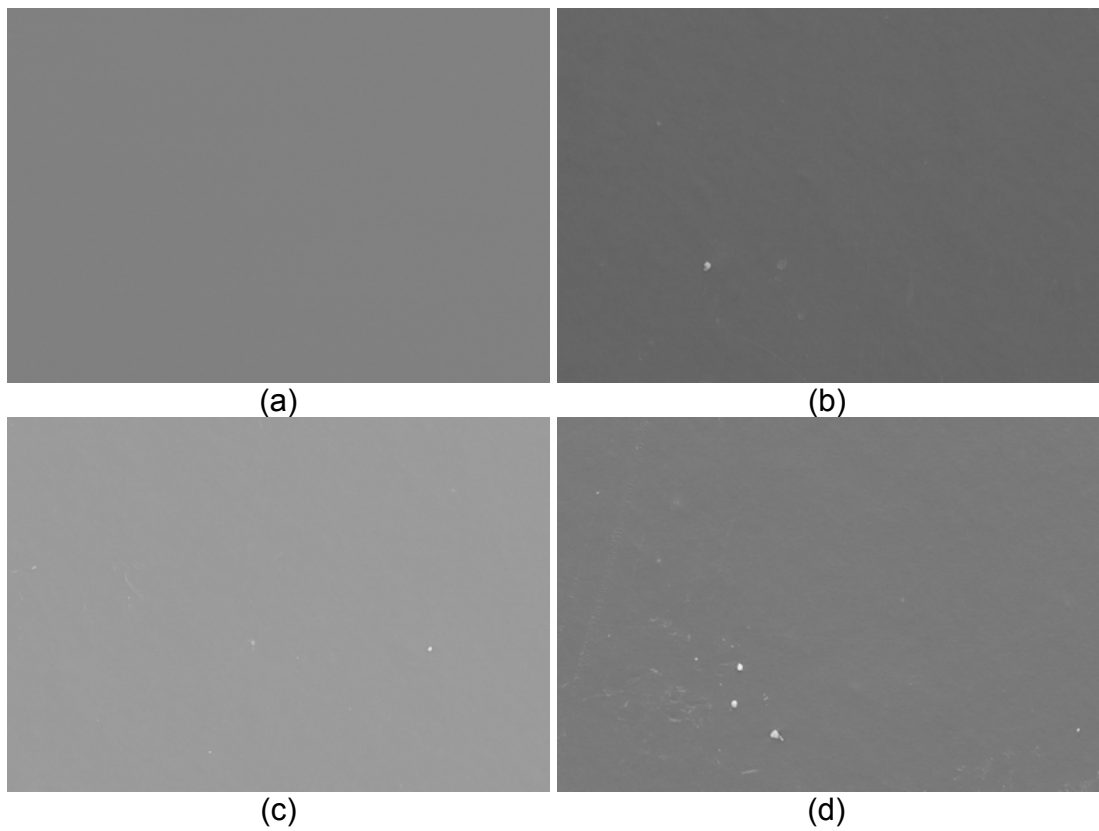


Figura 3 – Fotomicrografias superficiais dos filmes obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): tratamento A - controle (a); tratamento B (b); tratamento C (c) e tratamento D (d). (1.000 x)

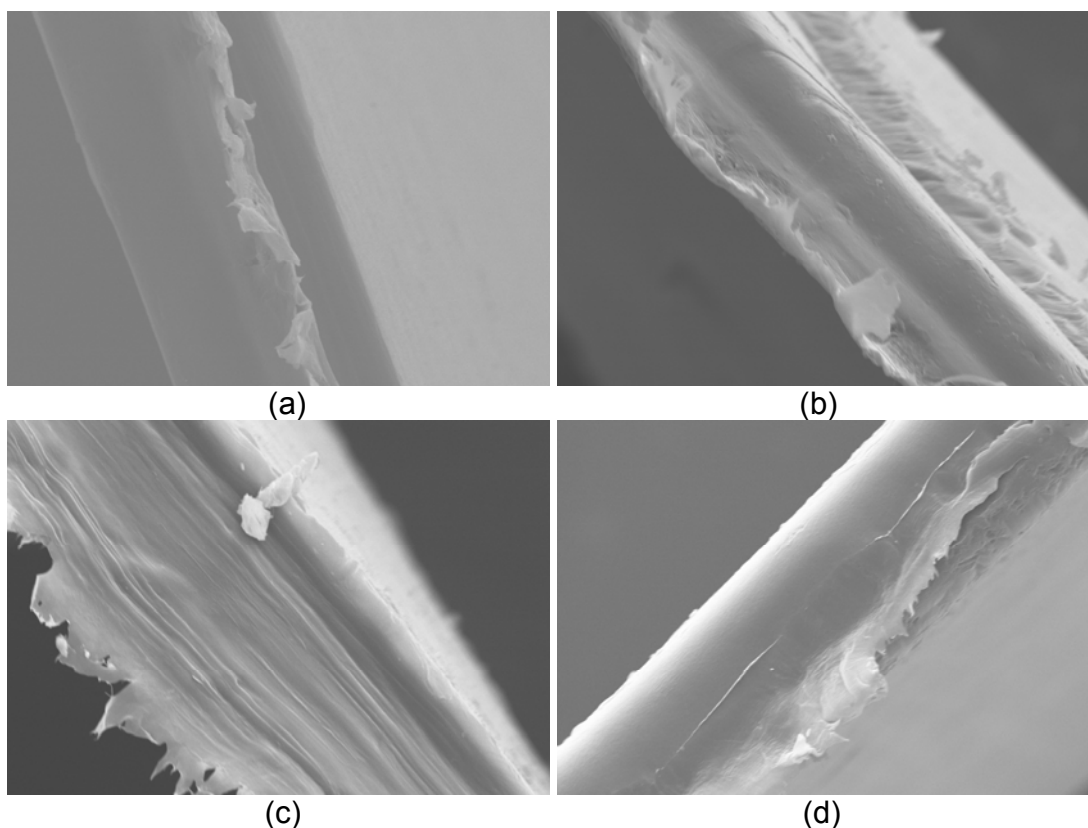


Figura 4 – Fotomicrografias do corte transversal dos filmes obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): tratamento A - controle (a); tratamento B (b); tratamento C (c) e tratamento D (d). (2.000 x)

As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica permitiram avaliar a microtopografia da superfície dos filmes em duas e três dimensões e ainda determinar a rugosidade média e quadrática dos filmes (Figuras 5 e 6). Observou-se que a incorporação do triclosan em filmes de PEBD não levou à modificação da microtopografia comparado ao filme controle (sem triclosan). Os valores médios da rugosidade média e quadrática para os filmes foram de  $116,30 \pm 21,75$  nm e  $137,02 \pm 24,47$  nm, respectivamente. Assim como na microscopia eletrônica de varredura, a não alteração da microtopografia dos filmes que continham antimicrobiano comparada ao filme controle pode ser explicada pela alta miscibilidade entre o polímero e o triclosan, em função da interação favorável entre estes.

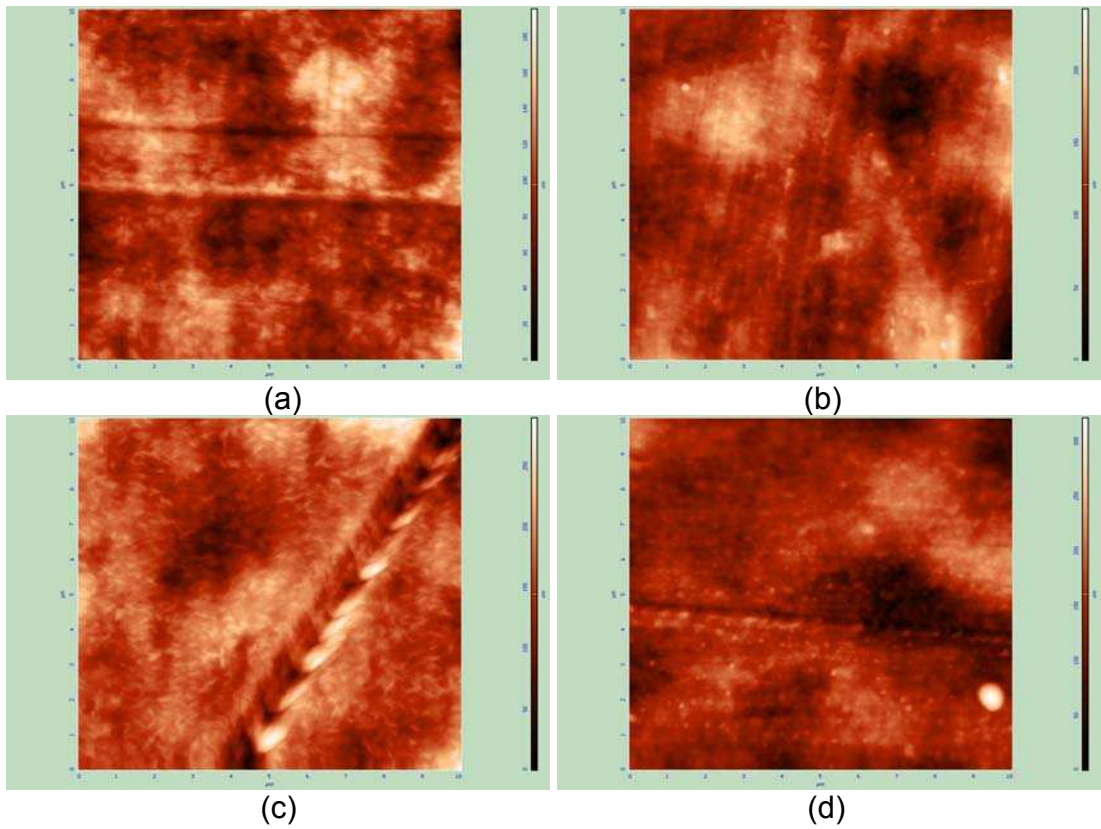


Figura 5 – Fotomicrografias em 2D dos filmes obtidas por microscopia de força atômica (MFA): tratamento A - controle (a); tratamento B (b); tratamento C (c) e tratamento D (d). (10 x 10  $\mu\text{m}$ )

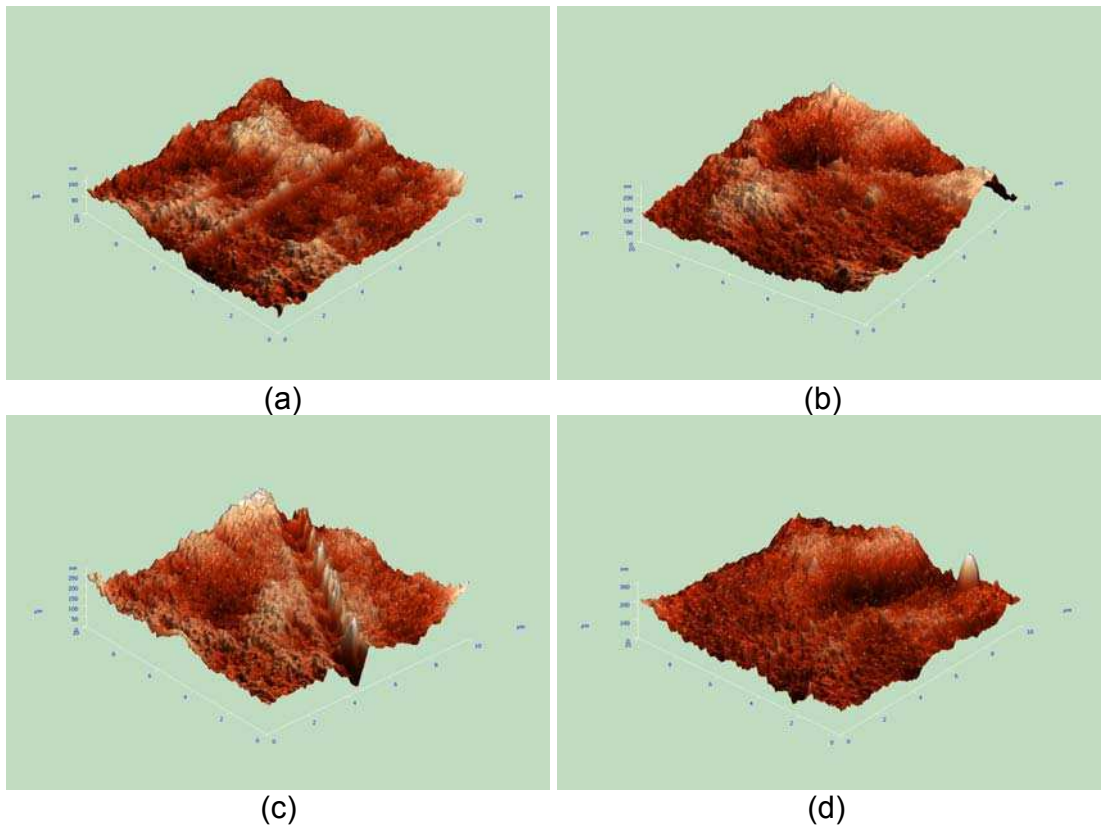


Figura 6 – Fotomicrografias em 3D dos filmes obtidas por microscopia de força atômica (MFA): tratamento A - controle (a); tratamento B (b); tratamento C (c) e tratamento D (d). (10 x 10  $\mu\text{m}$ )

#### **4. CONCLUSÃO**

As concentrações de triclosan avaliadas não foram totalmente incorporadas na mistura de resinas testadas.

A presença do triclosan nos filmes de polietileno de baixa densidade não alterou as características físico-mecânicas e microscópicas comparadas ao filme controle. Portanto, os filmes apresentam potencial de aplicação como embalagens de alimentos em relação as suas características mecânicas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHVENAINEN, R. Active and Intelligent Packaging. In: (Ed.) **Novel food packaging techniques**. Cap. 2, p. 5-19, Washington: CRC Press, 2003.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Immobilisation of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. **Packaging Technology and Science**, v. 10, p. 271-279, 1997.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D 882-02. Philadelphia: ASTM, 2002, 10 p.

ASTM – AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. Standard test method for water vapor transmission of materials. E 96-00. Philadelphia: ASTM, 2000, 9 p.

BHARGAVA, H.N.; LEONARD, P.A. Triclosan: applications and safety. **American Journal of Infection Control**, v. 24, p. 209-218, 1996.

BRODY, A.L.; STRUPINSKY, E.R.; KLINE, L.R. Antimicrobial Packaging. In: BRODY, A.L., STRUPINSKY, E.R., KLINE, L.R. (Eds.) **Active Packaging for Food Applications**. Cap. 10. Washington: CRC Press, 2001.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extend shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v. 78, p. 90-103, 2008.

COUTINHO, F.M.B.; MELLO, I.L.; SANTA MARIA, L.C. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.

CRIPPA, A. **Estudo do desempenho de filmes multicamadas em embalagens termoformadas**. 2006. 151f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CUTTER, C.N. The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 474-479, 1999.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; BOCKSTAL, A.; DEBEVERE, J. Study on antimicrobial activity of a food packaging material containing potassium sorbate. **Acta Alimentaria**, v. 29, p. 137-146, 2000.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, p. 54-65, 2000.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. In: AHVENAINEN, R. (Ed.) **Novel Food Packaging Techniques**. Cap. 4, p. 50 - 65, Washington: CRC Press, 2003.

HAN, J.H. Antimicrobials and package system design. Session 24, **Packaging tackles food safety: A look at antimicrobials**. In: 2002 ANNUAL MEETING AND FOOD EXPO. Anaheim – CA. Disponível em: <[http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper\\_9793.htm](http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_9793.htm)>. Acesso em: 06/06/2008.

HAN, J.H.; FLOROS, J.D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, v. 13, p. 287-298, 1997.

MING, X.; WEBER, G.H.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.E. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 413-415, 1997.

PETTERSEN, M. K.; NILSSON, A.; ESPEDAL, A.; KOHLER, A. Prediction of oxygen transmission rate for thermoformed trays. **Packaging Technology and Science**, v. 17, p. 321-332, 2004.

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

ROONEY, M.L. Overview of active food packaging. In: ROONEY, M.L. (Ed.) **Active food packaging**. Cap. 1, p. 1-37, Glasgow: Chapman e Hall, 1995.

ROVERSI, R.M.; MASSON, M.L. Qualidade da alface crespa minimamente processada acondicionada em atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 823-830, 2004.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N.F.S.; NOBREGA, J.E.; JUNIOR, M.A.W.; BARBOSA, K.B.F.; VOLP, A.C.P.; ZERDAS, E.R.M.A.; WURLITZER, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA\_ 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v. 20, n. 1, p. 85-89, 2009.

SCF. Opinion of the Scientific Committee on Food on the 10 th additional list of monomers and additives for food contact materials. Adopted by the SCF on 22/6/2000. CS/PM/GEN/M82 final, 11 July 2000. Disponível: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out62\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out62_en.pdf). Acesso em: 05/04/2008.

SCHWEIZER, H.P. Triclosan: a widely used biocide and its links to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p. 1-7, 2001.

SIRAGUSA, G.R.; CUTTER, C.N.; WILLETT, J.L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. **Food Microbiology**, v. 16, p. 229-235, 1999.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEVEBERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 163-171, 2002.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; VAN BEEST, M.; DEVEBERE, J. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.

WENG, Y.M.; CHEN, M.J. Sorbic anhydride as antimycotic additive in polyethylene food packaging films. **Food Science and Technology**, v. 10, p. 77-86, 1997.

WENG, Y.M.; HOTCHKISS, J.H. Inhibition of surface moulds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic imazalil. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 367-369, 1992.

WURLITZER, N.J. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan**. 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

## CAPÍTULO 2

### AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DO TRICLOSAN E DOS FILMES *IN VITRO*

#### RESUMO

Foram desenvolvidos filmes antimicrobianos de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporados com diferentes concentrações de produto à base triclosan. Avaliou-se a eficiência antimicrobiana *in vitro* dos filmes sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria innocua*. Além disso, determinou-se a concentração mínima inibitória para estes microrganismos e avaliou-se a capacidade destes desenvolverem mecanismos de resistência após sucessivas exposições ao produto à base de triclosan. Observou-se que os filmes contendo triclosan apresentaram eficiência antimicrobiana para *E. coli* e *S. aureus*, com formação de halos de inibição. Os diâmetros destes halos variaram em função da concentração de triclosan. Não houve formação de halo de inibição para *L. innocua*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*, no entanto, ocorreu uma pequena redução de densidade das colônias ao redor dos filmes, obtidos dos tratamentos com triclosan, para *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*. Após sucessivas exposições subletais ao triclosan, *E. coli* e *S. aureus* desenvolveram mecanismos de resistência a este antimicrobiano. Para *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *L. innocua*, a concentração mínima inibitória de triclosan ultrapassou a série de diluições do antimicrobiano preparada, portanto, não foram determinadas a concentração mínima inibitória exata e a capacidade de adaptação ao antimicrobiano para estes microrganismos.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de filmes antimicrobianos para embalar ou revestir alimentos tornou-se uma tendência mundial nas últimas décadas, que tem produzido diversos tipos de filmes utilizando uma variedade de compostos antimicrobianos (JOERGER, 2007).

Para o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas é necessário dispor de métodos de avaliação destas embalagens com relação à eficácia em reduzir a contagem microbiana de alimentos, ou de forma indireta, avaliar a capacidade da embalagem ativa em limitar o crescimento do microrganismo alvo (WURLITZER, 2007).

Para avaliar a eficiência antimicrobiana *in vitro* dos filmes ativos, vários métodos são comumente utilizados, destacando-se o método de difusão em ágar, a concentração mínima inibitória (CMI) e o método da suspensão em meio líquido.

No método de difusão em ágar, o filme antimicrobiano é colocado na placa contendo meio de cultura inoculado com o microrganismo teste. A placa é incubada em temperatura ótima de crescimento do microrganismo, sendo avaliada a formação de uma zona sem crescimento ao redor do filme. Essa zona indica a difusão do antimicrobiano do filme para o ágar, inibindo, assim, o crescimento microbiano. Este teste simula a eficiência do filme no acondicionamento de alimentos e prediz o processo de difusão do composto antimicrobiano do filme para a superfície dos alimentos. O método de difusão em ágar pode ser quantitativo se o diâmetro da zona de inibição ao redor do filme for mensurado (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

A concentração mínima inibitória é determinada por meio dos métodos de diluição em caldo ou ágar e permitem medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. O teste consiste em inocular uma série de tubos de ensaio ou placas, com meio caldo ou ágar contendo diversas concentrações do agente antimicrobiano, com uma suspensão padrão do microrganismo a ser testado. Os tubos ou placas

são incubados por um período de tempo predeterminado e visualmente analisados para o crescimento microbiano (turbidez). A concentração mínima inibitória é a menor concentração do agente antimicrobiano que resulta na inibição completa do crescimento do microrganismo teste (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002; NCCLS, 2003a). Os testes de sensibilidade são realizados quando acredita-se que o microrganismo é capaz de apresentar resistência ao agente antimicrobiano.

Segundo Russell (1997), o triclosan é considerado um biocida, em vez de um antibiótico, por apresentar inúmeros sítios intracelulares e citoplasmáticos como alvo. Esse ponto de vista foi desafiado com a evidência de que o triclosan pode atuar em um sítio específico, a enzima enoil-(proteína carreadora de acil) redutase, que está envolvida na síntese de ácidos graxos (McMURRY et al., 1998a). No entanto, segundo McDonnell e Pretzer (1998), embora a enzima enoil redutase seja o maior sítio alvo, o triclosan também influencia outros componentes. Se o triclosan agir como um inibidor específico, então, é provável o aparecimento de estirpes com altos níveis de resistência, como acontece com os antibióticos.

Resultados de pesquisas sugerem que a administração inapropriada de triclosan pode selecionar microrganismos resistentes, incluindo *P. aeruginosa* (CHUANHUEN et al., 2001), *E. coli* (McMURRY et al., 1998b; LEVY, 2001), *Salmonella enterica* (BRAOUDAKI e HILTON, 2004), entre outros. McMurry et al. (1998a) sugeriram que o triclosan atua em um alvo específico da bactéria, o que facilita a aquisição de resistência bacteriana.

As bactérias utilizam diversos mecanismos para desenvolver resistência ao triclosan incluindo mutações alvo, aumento da expressão alvo, efluxo ativo e enzimas degradativas (SCHWEIZER, 2001).

Várias bactérias possuem enzimas enoil-(proteína carreadora de acil) redutase homólogas resistentes a triclosan e, *P. aeruginosa* é a única dentre as bactérias Gram-negativas que possuem enzimas sensíveis e resistentes ao triclosan (HEATH et al., 2000). Além disso, Schweizer (1998) mostrou que

estirpes de *P. aeruginosa* são intrinsecamente resistentes ao triclosan pela expressão da bomba de efluxo MexAB-OprM.

Segundo McMurry et al. (1998), o triclosan é também um substrato de bombas de efluxo multidrogas em estirpes de *E. coli*.

Este trabalho teve como objetivos desenvolver filmes antimicrobianos de polietileno de baixa densidade (PEBD) incorporados com produto à base de triclosan, avaliar a eficiência antimicrobiana dos filmes *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria innocua*, determinar a concentração mínima inibitória do produto à base de triclosan sobre os mesmos microrganismos e verificar a capacidade destes desenvolverem mecanismos de resistência após sucessivas exposições ao produto à base de triclosan.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

### 2.1. Produção dos filmes antimicrobianos

Os filmes antimicrobianos foram produzidos por meio da extrusão de uma mistura de resinas de polietileno de baixa densidade (85%) com polietileno de alta densidade com alta capacidade de absorção (15%) (Accurel XP200), previamente incorporada com produto à base de triclosan. A relação da concentração das resinas foi determinada previamente por meio de testes preliminares.

A mistura de resinas foi submetida a três tratamentos com concentrações de 1%, 2% e 3% de produto à base de triclosan em relação ao peso da mistura e, ainda, foi produzido um filme controle sem adição de antimicrobiano. As concentrações foram baseadas na quantidade limite de difusão do triclosan para o alimentos ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e em testes preliminares de extrusão com diferentes níveis de triclosan. Para a incorporação do antimicrobiano, a mistura dos polímeros com triclosan foi colocada em um balão de fundo chato contendo metiletilcetona, acoplado a um condensador, e mantida em banho-maria a  $90 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante duas horas. Posteriormente, a mistura foi filtrada em papel de filtro e deixada em repouso até a completa evaporação do solvente. A resina, sem triclosan, também foi submetida ao mesmo processo.

A quantidade do antimicrobiano incorporada na mistura de resinas foi determinada por meio de um balanço de massa. Inicialmente, determinou-se a quantidade de polietileno perdido em função do processo de aquecimento da resina com o solvente. Para tal, a mistura de resina, sem adição do produto à base de triclosan, foi submetida ao mesmo processo utilizado para a

incorporação do antimicrobiano. O resíduo de polietileno perdido foi calculado pela diferença entre o peso da resina antes e após o processo de incorporação. Para o cálculo do antimicrobiano incorporado, subtraiu-se a quantidade de triclosan adicionada da não incorporada, sendo que esta foi determinada subtraindo-se do peso da resina incorporada, o peso de resina mais triclosan adicionados e o peso do resíduo de polietileno perdido durante o processo.

O processo de extrusão foi realizado em uma extrusora mono-rosca (Thermo, modelo HAAKE POLYDRIVE R600/610), equipada com cinco zonas de aquecimento, cujas temperaturas foram mantidas a 130 °C, 140 °C, 150 °C, 160 °C e 170 °C da zona de alimentação à saída da matriz. Utilizou-se uma matriz tubular e a rotação da rosca foi de 30 rpm.

## **2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes *in vitro***

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes *in vitro* foi realizada por meio do método de difusão em ágar. Foram utilizadas culturas de *E. coli* (ATCC 11229), *S. aureus* (ATCC 6538), *L. innocua* (ATCC 33090), *S. choleraesuis* (ATCC 6539) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), por serem os microrganismos patogênicos veiculados por alimentos e utilizados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a avaliação da eficiência de sanitizantes.

Inóculos de cada microrganismo foram preparados por meio da suspensão direta, em solução salina esterilizada, de colônias isoladas, selecionadas de uma placa de meio não seletivo inoculada com o microrganismo e incubada a 35 °C por 18-24 horas. A suspensão foi ajustada até sua turbidez coincidir com a da solução padrão de McFarland 0,5. Placas de ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com os microrganismos friccionando-se um swab de algodão esterilizado umedecido com a solução do inóculo previamente preparado. Sobre a superfície do ágar inoculado foram colocados discos ( $\emptyset = 1$  cm) dos filmes esterilizados em câmara com lâmpada UV

(Prodicil, 110v, 254 nm) por 2 minutos. As placas foram incubadas a 35 °C e após 16-18 horas os halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco (NCCLS, 2003b).

### **2.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)**

A determinação da concentração mínima inibitória do produto à base de triclosan foi realizada utilizando-se o método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio (NCCLS, 2003a). Foram preparadas, volumetricamente, as diluições do produto à base de triclosan em caldo Mueller-Hinton, conforme descrito na norma. Inóculos de *E. coli* (ATCC 11229), *S. aureus* (ATCC 6538), *L. innocua* (ATCC 33090), *S. choleraesuis* (ATCC 6539) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442) foram preparados, separadamente, por meio da suspensão direta, em solução salina esterilizada, de colônias isoladas selecionadas de uma placa de meio não seletivo inoculada com cada microrganismo e incubada a 35 °C por 18-24 horas. A suspensão foi ajustada até sua turbidez coincidir com a da solução padrão de McFarland 0,5 ( $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Diluiu-se o inóculo ajustado de forma que após a inoculação cada tubo contivesse, aproximadamente,  $5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Após a inoculação, os tubos foram incubados a 35 °C, durante 16 a 20 horas. A concentração mínima inibitória é a menor concentração do triclosan que inibe completamente o crescimento do microrganismo nos tubos, conforme detectado por observação visual da turbidez.

O primeiro tubo abaixo da concentração mínima inibitória que apresentou crescimento foi utilizado para inocular uma nova série de tubos contendo concentrações crescentes do produto à base de triclosan, a fim de avaliar a capacidade da bactéria de desenvolver mecanismos de resistência após sucessivas exposições ao antimicrobiano. Este procedimento foi realizado

diariamente até a obtenção de um aumento significativo (>1 log) da concentração mínima inibitória (BRAOUDAKI E HILTON, 2004).

#### **2.4 – Análise estatística dos resultados**

Os experimentos foram realizados em 3 repetições no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram analisados por meio de Análise de Variância ao nível de 5% de probabilidade e análise de regressão ao nível de 1% de probabilidade, com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as porcentagens de produto à base de triclosan adicionadas à mistura de resinas e as porcentagens incorporadas na mistura. A porcentagem incorporada equivale à concentração final do antimicrobiano nos filmes dos diferentes tratamentos.

Tabela 1 – Porcentagem de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas.

Tratamento	% adicionada na mistura	% presente nos filmes
A	0	0
B	1	0,460 ± 0,065
C	2	0,826 ± 0,075
D	3	1,080 ± 0,059

Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na porcentagem de produto à base de triclosan incorporada da mistura de resinas. Na Figura 1 está ilustrado a variação da concentração de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas. Observou-se que a concentração de produto à base de triclosan incorporada aumentou, de forma constante, em função da quantidade do antimicrobiano adicionada. Estima-se que, apenas 36% da quantidade de triclosan adicionada foi incorporada nas resinas e, portanto, está presente no filme.

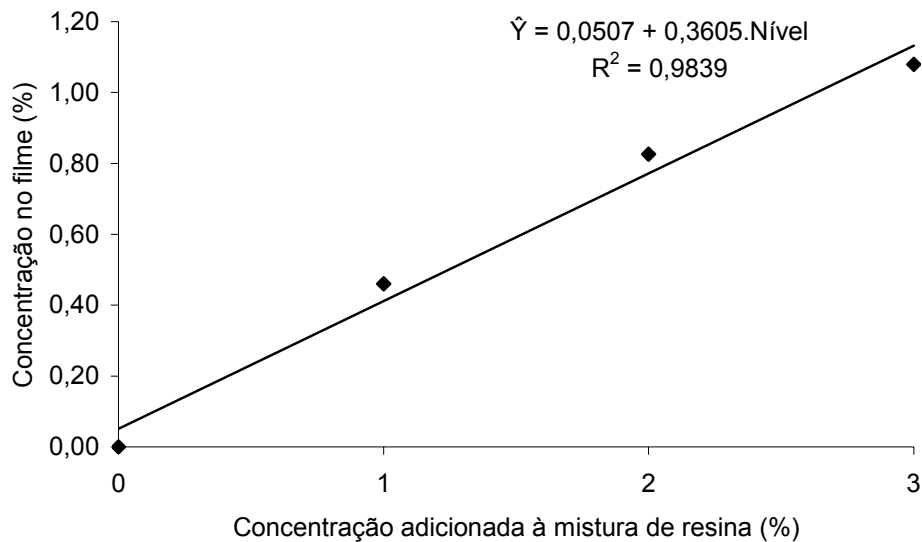


Figura 1 – Variação da concentração de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas.

Observou-se o efeito antimicrobiano ( $p < 0,05$ ) dos filmes contendo diferentes concentrações de produto à base de triclosan na formação de halos de inibição para *E. coli* e *S. aureus*. Os filmes contendo triclosan apresentaram eficiência antimicrobiana crescente em relação a concentração do composto antimicrobiano para estas bactérias (Figura 2).

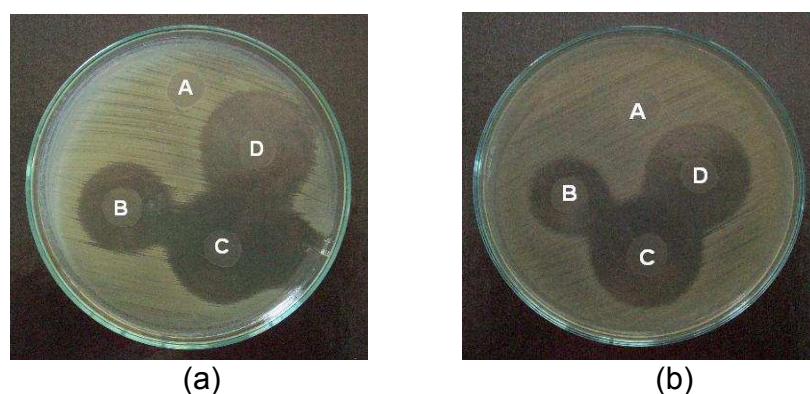


Figura 2 – Formação de halos de Inibição de *Escherichia coli* (a) e de *Staphylococcus aureus* (b) pelos filmes dos diferentes tratamentos: tratamento com 0% - controle (A); tratamento com 1% (B); tratamento com 2% (C) e tratamento com 3% (D).

Os diâmetros médios dos halos de inibição para *E. coli* e *S. aureus* pelos filmes com diferentes concentrações de produto à base de triclosan encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Diâmetro médio dos halos de inibição para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* formados pelos filmes contendo diferentes concentrações do produto à base de triclosan.

Tratamentos	Diâmetro (cm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tratamento com 0% (Controle)	0	0
Tratamento com 1%	2,50 ± 0,49	2,57 ± 0,26
Tratamento com 2%	3,18 ± 0,28	3,00 ± 0,05
Tratamento com 3%	3,53 ± 0,08	3,25 ± 0,05

Observou-se um aumento dos diâmetros dos halos de inibição com o aumento da concentração de triclosan para ambos microrganismos (Figuras 3 e 4).

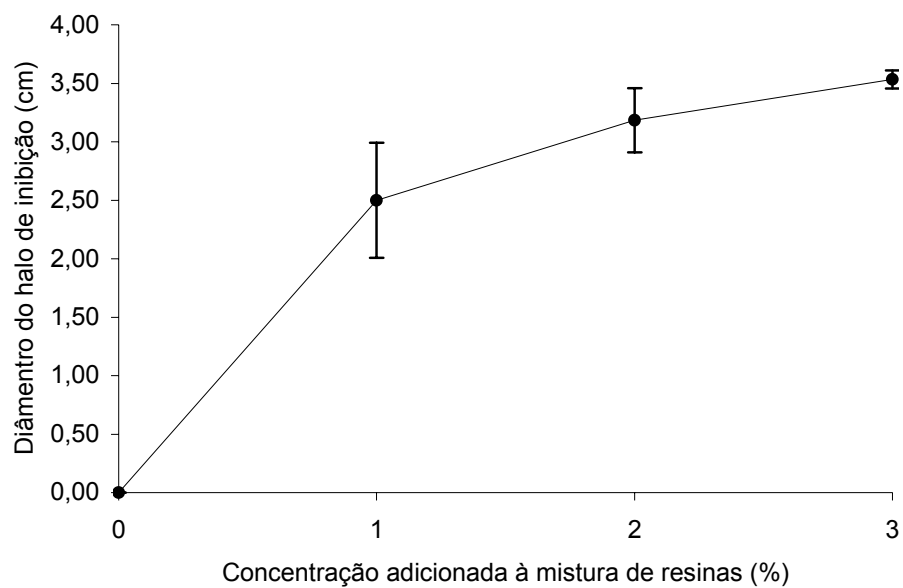


Figura 3 – Variação do diâmetro do halo de inibição para *Escherichia coli* em função dos tratamentos com diferentes concentrações de produto à base de triclosan.

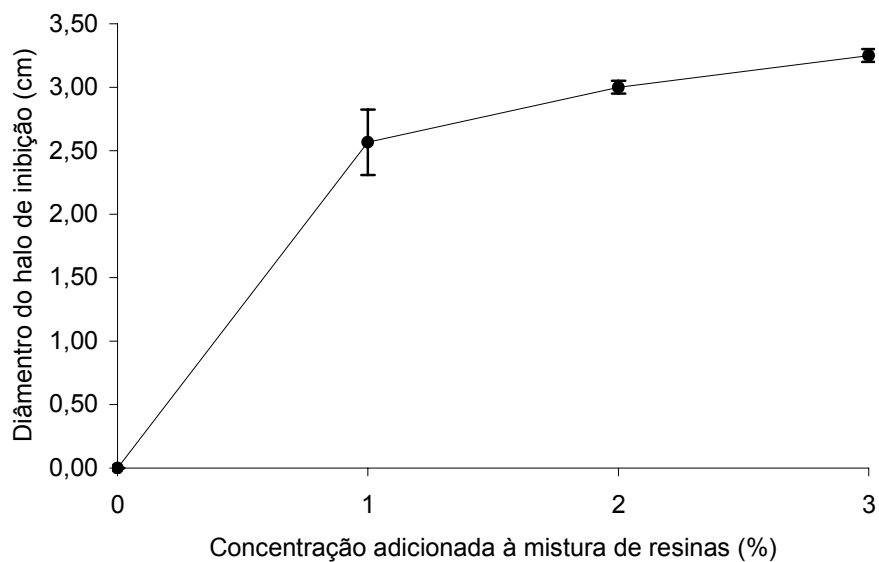


Figura 4 – Variação do diâmetro do halo de inibição para *Staphylococcus aureus* em função dos tratamentos com diferentes concentrações de produto à base de triclosan.

Não houve formação de halo de inibição para *L. innocua*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*. No entanto, ocorreu uma pequena redução de densidade das colônias ao redor dos filmes, obtidos dos tratamentos com triclosan, para *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* (Figura 5). A não formação de halos de inibição pode ser explicada pelo fato da difusão de triclosan para o meio de cultura não ter atingido a concentração mínima inibitória para estas bactérias. Por exemplo, para *P. aeruginosa*, observa-se alta concentração mínima inibitória, com valores de até 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para algumas estirpes (CHUANCHUEN, 2003).

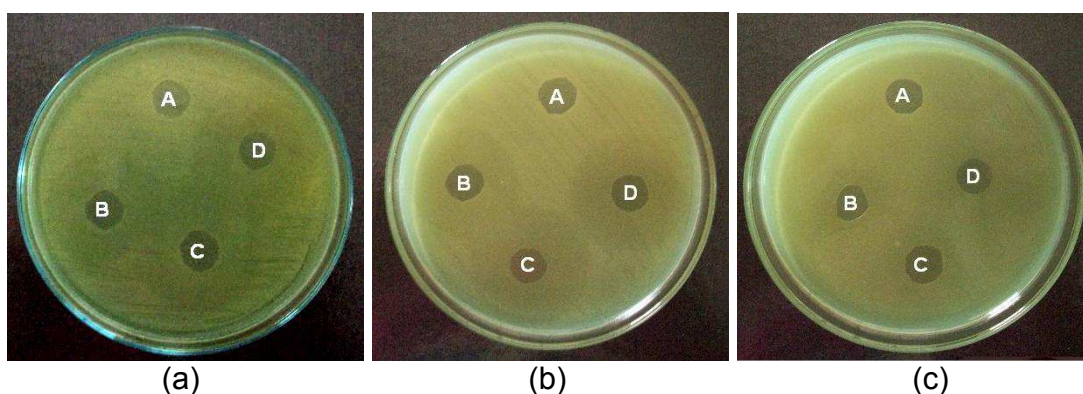


Figura 5 – Inibição de *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Salmonella choleraesuis* (b) e *Listeria innocua* (c) por filmes obtidos dos diferentes tratamentos: tratamento com 0% - controle (A); tratamento com 1% (B); tratamento com 2% (C) e tratamento com 3% (D).

Wurlitzer (2007) observou efeito antimicrobiano de filmes de PVdC incorporados com diferentes concentrações de triclosan, com formação de halo de inibição, para *S. aureus*, *S. choleraesuis*, *E. coli* e *Klebsiella*. Para *Listeria monocytogenes* e *P. aeruginosa* também não houve formação de halo de inibição.

Cutter (1999), ao avaliar a eficiência antimicrobiana *in vitro* de filme plástico incorporado com 1500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de triclosan, verificou que o plástico inibiu o crescimento de *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella* Typhimurium, *S.*

*aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *E. coli* e várias estirpes de *E. coli* O157:H7.

O efeito inibitório de filmes de polietileno de baixa densidade contendo 0, 500 e 1000 mg.kg<sup>-1</sup> de triclosan foi avaliado em teste de difusão em ágar. Observou-se efeito antimicrobiano dos filmes com triclosan contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* O157:H7, e *B. thermosphacta* ( VERMEIREN et al., 2002).

A formação de halo de inibição está relacionada com a difusão do antimicrobiano e com a velocidade de crescimento do microrganismo. Esses parâmetros sofrem influência do estado fisiológico da cultura indicadora, da composição do ágar (TOLEDO, 2000), da estrutura química e do nível de ligações cruzadas dos filmes (CAGRI et al., 2001).

O progresso de adaptação de *E.coli* e *S. aureus* ao triclosan mostra que ambas as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência ao triclosan, após sucessivas exposições subletais ao antimicrobiano (Figura 6). A concentração mínima inibitória de triclosan aumentou de 0,125 para 16 µg.mL<sup>-1</sup> após sete exposições, enquanto que para *E. coli* aumentou de 0,25 para 16 µg.mL<sup>-1</sup>, após um número menor de exposições subletais. A diferença entre o processo de adaptação de *S. aureus* em comparação com *E. coli* está na velocidade com que estas bactérias desenvolvem mecanismo de resistência. Após a primeira exposição ao triclosan, *S. aureus* torna-se resistente mais rápido do que *E. coli*.

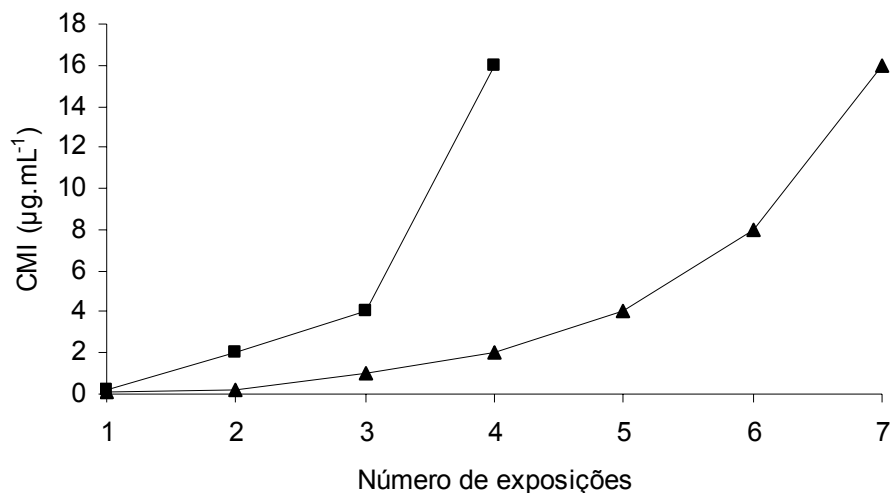


Figura 6 - Perfis de adaptação de *Escherichia coli* (▲) e *Staphylococcus aureus* (■) ao triclosan.

Para *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *L. innocua*, a concentração mínima inibitória ultrapassou a série de diluições de triclosan preparada, o que significa que a concentração mínima inibitória de triclosan para estas bactérias foi maior que 16 µg.mL<sup>-1</sup>.

A concentração mínima inibitória de triclosan encontrada para *S. aureus* está de acordo com Suller e Russell (2000), que encontraram valores entre 0,025 e 1 µg.mL<sup>-1</sup> para várias estipes de *S. aureus*.

Suller e Russell (2000) isolaram mutantes de *S. aureus* resistentes ao triclosan e determinaram a concentração mínima inibitória destes após a propagação de colônias em meio com e sem o antimicrobiano. Todos os mutantes apresentaram maior concentração mínima inibitória, no entanto, para alguns, a concentração mínima inibitória foi igual após as células terem sido inoculadas em meio com e sem triclosan, indicando a estabilidade da resistência, e para outros, a resistência foi perdida quando as células cresceram em ausência de triclosan.

Após exposições sucessivas ao triclosan, *E. coli* atingiu valor de concentração mínima inibitória menor do que o encontrado por Braoudaki e Hilton (2004). Estes autores testaram várias estipes de *E. coli* e observaram

um aumento da resistência destas estirpes ao triclosan, sendo que a concentração mínima inibitória aumentou de 0,25 para 2048  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Estudos têm indicado que o triclosan atua como um inibidor competitivo da enzima enoil-(proteína carreadora de acil) redutase (FabI), bloqueando a síntese de ácidos graxos em bactérias (McMURRY, 1998b). Segundo Kaylon e Olgun (2001), se o triclosan é realmente um agente antimicrobiano específico, deve ser usado com critério e em concentrações maiores que a mínima concentração inibitória para evitar o aparecimento de estirpes resistentes.

#### 4. CONCLUSÃO

Os filmes incorporados com triclosan apresentaram efeito antimicrobiano sobre os microrganismos patogênicos, *E. coli* e *S. aureus*, que podem ser veiculados por alimentos. Portanto, os filmes antimicrobianos apresentam potencial para serem aplicados como embalagens ativas para alimentos, o que pode auxiliar na garantia da segurança alimentar.

Os filmes antimicrobianos podem ser importantes para o aumento da vida de prateleira dos alimentos pelo controle da contaminação superficial dos alimentos por microrganismos deterioradores.

*S. aureus* e *E. coli* foram mais sensíveis à ação do triclosan comparado a *P. aeruginosa*, *L. innocua* e *S. choleraesuis*. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos a fim de verificar os mecanismos utilizados pelos microrganismos para desenvolverem resistência ao triclosan e a possibilidade de ocorrer resistência cruzada entre triclosan e antibióticos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A.C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 73-78, 2004.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial, mechanical and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acid. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6. p. 865-870, 2001.

CHUANCHUEN, H.N. BEINLICH, K., HOAND, T.T., BECHER, A., KARKHOFF-SCHWEIZER, R.R, SCHWEIZER, H. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: Exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 428-432, 2001.

CHUANCHUEN, R. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. **American Journal of Infection Control**. v. 31, n.2, p. 124-127, 2003.

CUTTER, C.N. The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 474-479, 1999.

HEATH, R.J.; ROCK, C.O. A triclosan-resistant bacterial enzyme. **Nature**, n. 406, p. 145-146, 2000.

JOERGER, R.D. Antimicrobial films for food applications: a quantitative analysis of their effectiveness. **Packaging Technology and Science**, v. 20, p. 231-273, 2007.

KAYLON, B.D.; OLGUN,U. Antibacterial efficacy of triclosan-incorporates polymers. **American journal of Infect Control**, v.29, n. 2, p. 124-125, 2001.

LEVY, S.B. Antibacterial household products: cause for concern. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 512-515, 2001.

McDONNELL, G.; PRETZER, D. Action and targets of triclosan. **ASM News**, v. 64, p. 670-671, 1998.

McMURRY, L.M., OETHINGER, M. LEVY, S.B. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, n. 2, p. 305-309, 1998a.

McMURRY, L.M., OETHINGER, M. LEVY, S.B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 531-532, 1998b.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Norma aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Norma aprovada - Oitava Edição. M2-A8, v. 23, n. 1, 2003b.

RUSSELL, A.D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 155-165, 1997.

SCHWEIZER, H.P. Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 394-398, 1998.

SCHWEIZER, H.P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 1, p. 1-7, 2001.

SULLER, M.T.E.; RUSSELL, A.D. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n.1, p. 11-18, 2000.

TOLEDO, M.M. **Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, 2000.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEVEBERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 163-171, 2002.

WURLITZER, N.J. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan**. 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS FILMES EM CARNE BOVINA E DA DIFUSÃO DO TRICLOSAN DO FILME PARA O ALIMENTO**

#### **RESUMO**

Desenvolveram-se filmes antimicrobianos de polietileno de baixa densidade incorporados com diferentes concentrações de triclosan. A eficiência antimicrobiana dos filmes em carne bovina foi avaliada pela inibição do crescimento de bactérias lácticas e enterobactérias em bifes embalados à vácuo e de *Pseudomonas* sp. e psicrotróficos em bifes embalados em bandejas de poliestireno envolvidas com poli(cloreto de vinila). Avaliou-se também a difusão do triclosan dos filmes para a carne nos dois tipos de embalagem. Os filmes não reduziram a contagem de bactérias lácticas, de enterobactérias e de *Pseudomonas* sp. na carne durante o período de estocagem. Os filmes apresentaram efeito na contagem de psicrotróficos, sendo que o filme do tratamento com 3% de triclosan foi o que apresentou melhor efeito sobre esses microrganismos. A difusão do triclosan dos filmes com 3% de triclosan para a carne embalada em bandejas de poliestireno ultrapassou o limite estabelecido pela Comunidade Européia após o 6º dia de estocagem da carne em contato com o filme do tratamento. Para os demais casos a quantidade de triclosan encontrada na carne foi inferior ao limite permitido.

#### **1. INTRODUÇÃO**

A carne é considerada uma fonte importante de proteínas de alto valor biológico na dieta humana. As proteínas exercem diversas funções importantes no organismo humano, como construção e manutenção dos tecidos, formação

de enzimas, hormônios e anticorpos, fornecimento de energia e regulação do metabolismo (PIRES et al., 2006).

Produtos cárneos frescos são comercializados comumente em temperaturas de refrigeração entre 2 °C e 5 °C. No entanto, muitas mudanças indesejáveis podem acontecer durante a refrigeração associada ao crescimento microbiano e à oxidação de lipídios, que dão origem à redução de qualidade, deterioração da carne e perda econômica (SALLAM e SAMEJIMA, 2004).

A carne é um alimento rico em nutrientes, portanto representa um ambiente favorável para multiplicação de microrganismos deterioradores e patógenos veiculados por alimentos (AYMERICH et al., 2008).

Além de exigir um fornecimento adequado de nutrientes, a capacidade de crescimento das bactérias depende das condições do ambiente. Variações de temperatura, oxigênio, pH, atividade de água e outras condições ambientais determinam não só a capacidade de crescimento da bactéria, mas também as espécies capazes de crescer sob essas condições. A carne apresenta as exigências nutricionais da maioria das bactérias. Apesar do baixo conteúdo de carboidratos, nutriente utilizado por muitas bactérias, a carne é uma fonte rica em proteínas, ideal para as bactérias capazes de metabolizar aminoácidos. A carne tem alta atividade de água e pH entre 5,6 e 5,8, que está dentro do limite aceitável para a maioria das bactérias (THOMAS, 2007).

A qualidade microbiológica de carne e derivados é altamente influenciada pelas condições higiênicas durante sua produção e comercialização (BARROS et al., 2007). Os açougues representam uma importante fonte de contaminação em função das más condições higiênicas do ambiente, superfícies, manipuladores, equipamentos e utensílios. A higienização inadequada dos estabelecimentos que comercializam produtos cárneos aumenta a probabilidade de contaminação, que leva a uma redução na vida de prateleira e aumenta a possibilidade de presença de microrganismos patogênicos. Segundo Legnani et al. (2004), um dos principais fatores de risco na transmissão de doenças veiculadas por alimentos é a contaminação cruzada que ocorre entre o alimento e as superfícies de preparo.

A contaminação microbiana reduz a vida de prateleira dos alimentos e aumenta o risco de doenças veiculadas por alimentos (QUINTAVALLA e VICINI, 2002). Grandes perdas econômicas ocorrem por ano em função das infecções e intoxicações causadas por alimentos contaminados com microrganismos e, ou toxinas.

Quando se trata de bactérias patogênicas e deterioradoras de importância em carnes, são relativamente poucas as espécies responsáveis pela maior parte das perdas. Os patógenos que mais preocupam são *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Essas bactérias estão presentes em baixas contagens e em um número limitado de carcaças. No entanto, pequenas quantidades dessas bactérias são necessárias para causar doenças e, eventualmente, a morte, quando pessoas consomem produtos contaminados. Portanto, métodos para controlar o crescimento bacteriano sobre a carne bovina devem considerar as exigências do crescimento destes importantes patógenos. O controle desses microrganismos com frequência envolve a alteração das condições de armazenamento da carne, no entanto, essas condições podem permitir o crescimento de algumas bactérias deterioradoras (THOMAS, 2007).

A deterioração de carne refrigerada em presença de oxigênio pode ocorrer por diversas bactérias. Espécies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Psychrobacter* são normalmente as de importância (DAINTY e MACKEY, 1992). Segundo Oussalah et al. (2004), a carne fresca tem pequena vida de prateleira que varia de 3 a 5 dias, quando mantida à temperatura de 4 °C, sendo *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* as principais responsáveis pela sua deterioração.

O armazenamento de carne à vácuo inibe o crescimento de *Pseudomonas* sp., principal responsável pela deterioração de carne sob presença de oxigênio, e favorece o crescimento de bactérias lácticas (LAB), embora ocorra também um crescimento significativo da *Brochothrix thermosphacta*, *Alteromonas putrefaciens* e *Enterobacteriaceae*. Sob condições anaeróbicas, as bactérias lácticas têm uma vantagem considerável na taxa de

crescimento sobre espécies anaeróbias facultativas (JAMES e JAMES, 2002), sendo, portanto, o principal motivo da deterioração de carne embalada à vácuo.

Minimizar a contaminação do produto e retardar ou inibir o crescimento de microrganismos deterioradores e patogênicos nos produtos são as principais ferramentas para aumentar a vida de prateleira de carne fresca e garantir a segurança do consumidor (SALLAM e SAMEJIMA, 2004).

Métodos tradicionais para diminuir ou eliminar a ação de microrganismos sobre os alimentos incluem processamento térmico, secagem, congelamento, refrigeração, irradiação, atmosfera modificada e adição de agentes antimicrobianos ou sais. No entanto, algumas dessas técnicas não podem ser aplicadas em alguns alimentos, como carne fresca e produtos prontos para consumo. O uso de embalagens ativas antimicrobianas constitui uma forma promissora de controlar a contaminação microbiana, em particular para produtos cárneos (QUINTAVALLA e VICINI, 2002).

O uso de embalagens contendo agentes antimicrobianos tem como vantagem a difusão desses compostos da embalagem para a superfície do alimento de maneira controlada que, desta forma, estarão presentes em menores concentrações, atendendo uma demanda atual do consumidor que é a busca por alimentos livres de conservantes, e apenas onde sua presença é requerida, ou seja, especialmente na superfície do produto, onde a maior parte das deteriorações ocorre. Quando o antimicrobiano é liberado da embalagem ao longo do tempo, a cinética de crescimento microbiano e a atividade antimicrobiana na superfície do produto podem ser equilibradas e, dessa forma, a atividade antimicrobiana da embalagem pode ser estendida, garantindo a segurança durante a distribuição dos alimentos (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002; QUINTAVALLA e VICINI, 2002, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

Outra vantagem dos sistemas de embalagens ativas está relacionada ao fato de que alguns agentes antimicrobianos adicionados ao alimento podem perder parcialmente sua atividade em virtude da composição do produto e, portanto, seu efeito na superfície do alimento pode ser limitado. Dessa forma, a utilização de embalagens ativas pode assegurar melhor eficácia do composto

bactericida ou bacteriostático, por permitir difusão lenta do agente da embalagem para o alimento, auxiliando na manutenção de concentrações mais altas na superfície do produto (QUINTAVALLA e VICINI, 2002).

O triclosan (2,4,4'-triclóro-2'-hidroxidifenil-eter) é um agente antimicrobiano sintético com amplo espectro de ação, apresentando eficiência sobre várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SULLER e RUSSELL, 2000).

Até a descrição de um mecanismo de ação específico, o triclosan foi considerado um biocida não-específico que atuava atacando e rompendo a membrana celular bacteriana de forma que a bactéria não pudesse assimilar nutrientes essenciais para sobrevivência (VERMEIREN et al., 2002). Entretanto, em alguns estudos constatou-se que o triclosan atua em um sítio específico, como um substrato natural da enzima enoil-(proteína carreadora de acil) redutase (FabI), inibindo-a e, dessa forma, bloqueando a síntese de ácidos graxos em bactérias (McMURRY et al., 1998; HEATH et al., 1998; HEATH et al., 1999; LEVY et al., 1999)

O composto triclosan teve seu uso aprovado para contato com alimentos pelo Scientific Committee for Food (SCF) da Comunidade Européia, com o limite de 5 mg/kg de alimento (SCF, 2000).

A eficiência antimicrobiana do triclosan é alcançada pela incorporação na maioria dos polímeros como polietileno, polipropileno, poli(cloreto de vinila), entre outros. O triclosan insere-se nos espaços vazios do polímero e difunde para a superfície do alimento para inibir o crescimento das bactérias (COMA, 2006).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver filmes poliolefinicos incorporados com diferentes concentrações de triclosan, avaliar a eficiência antimicrobiana dos filmes em carne bovina e avaliar a difusão do triclosan dos filmes para a carne.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

### 2.1. Produção dos filmes antimicrobianos

Os filmes antimicrobianos foram produzidos por meio da extrusão de uma mistura de resinas de polietileno de baixa densidade (85%) com polietileno de alta densidade com alta capacidade de absorção (15%) (Accurel XP200), previamente incorporada com produto à base de triclosan. A relação da concentração das resinas foi determinada previamente por meio de testes preliminares.

A mistura de resinas foi submetida a três tratamentos com concentrações de 1%, 2% e 3% de produto à base de triclosan em relação ao peso da mistura e, ainda, foi produzido um filme controle sem adição de antimicrobiano. As concentrações foram baseadas na quantidade limite de difusão do triclosan para o alimentos ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e em testes preliminares de extrusão com diferentes níveis de triclosan. Para a incorporação do antimicrobiano, a mistura dos polímeros com triclosan foi colocada em um balão de fundo chato contendo metiletilcetona, acoplado a um condensador, e mantida em banho-maria a  $90 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante duas horas. Posteriormente, a mistura foi filtrada em papel de filtro e deixada em repouso até a completa evaporação do solvente. A resina, sem triclosan, também foi submetida ao mesmo processo.

A quantidade do antimicrobiano incorporada na mistura de resinas foi determinada por meio de um balanço de massa. Inicialmente, determinou-se a quantidade de polietileno perdido em função do processo de aquecimento da resina com o solvente. Para tal, a mistura de resina, sem adição do produto à base de triclosan, foi submetida ao mesmo processo utilizado para a

incorporação do antimicrobiano. O resíduo de polietileno perdido foi calculado pela diferença entre o peso da resina antes e após o processo de incorporação. Para o cálculo do antimicrobiano incorporado, subtraiu-se a quantidade de triclosan adicionada da não incorporada, sendo que esta foi determinada subtraindo-se do peso da resina incorporada, o peso de resina mais triclosan adicionados e o peso do resíduo de polietileno perdido durante o processo.

O processo de extrusão foi realizado em uma extrusora mono-rosca (Thermo, modelo HAAKE POLYDRIVE R600/610), equipada com cinco zonas de aquecimento, cujas temperaturas foram mantidas a 130 °C, 140 °C, 150 °C, 160 °C e 170 °C da zona de alimentação à saída da matriz. Utilizou-se uma matriz tubular e a rotação da rosca foi de 30 rpm.

## **2.2. Obtenção da carne bovina**

Carne bovina (alcatra), fatiada manualmente em forma de bife, foi adquirida em supermercado local da cidade de Viçosa e transportada imediatamente para o Laboratório de Embalagens.

## **2.3. Acondicionamento e estocagem da carne bovina**

Os bifes de alcatra intercalados com os filmes foram acondicionados à vácuo, em sacos de PE/Náilon (90 µm de espessura) (Figura 1), ou em bandejas de poliestireno envolvidas com poli(cloreto de vinila) (PVC) (Figura 2), e estocados em temperatura de  $7 \pm 2$  °C. Os bifes embalados à vácuo (-720 mmHg), submetidos aos quatro tratamentos, foram analisados nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 30 dias de armazenamento, enquanto os bifes em bandejas de poliestireno foram analisados nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias de armazenamento.



Figura 1 – Porção de alcatra em contato com o filme antimicrobiano e acondicionado à vácuo em sacos de PE/Nailon.



Figura 2 – Porção de alcatra em contato com o filme antimicrobiano e acondicionado em bandeja de poliestireno envolvida com PVC.

## 2.4. Análises microbiológicas

Em cada tempo, os bifes embalados à vácuo foram analisados quanto a contagem de bactérias lácticas e de enterobactérias e os bifes acondicionados em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC foram analisados quanto à contagem de *Pseudomonas* sp. e de bactérias psicotróficas.

Foram utilizados os meios de cultura ágar MRS, ágar Viotela Vermelho Bile (VRB) (DIFCO®), ágar cetrimida (Merck®) Plate Count Agar (PCA) para o plaqueamento de bactérias lácticas, enterobactérias, *Pseudomonas* sp. e bactérias psicotróficas, respectivamente.

Porção de 25 g de bife acondicionado em contato com cada tipo de filme foi coletada assepticamente e adicionada de 225 mL de água peptonada (0,1%). A mistura foi homogeneizada por 1 minuto em Stomacher OTR, modelo 1240 e diluições seriadas foram efetuadas para posterior plaqueamento. Para bactérias lácticas e enterobactérias foi utilizada a técnica de *Pour Plate* e para *Pseudomonas* sp. e bactérias psicotróficas a técnica *Spread Plate*.

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 a 48 horas, para enterobactérias, a  $25 \pm 2$  °C por 48 horas, para *Pseudomonas* sp., a  $7 \pm 2$  °C por 7 a 10 dias, para psicotróficos e a  $35 \pm 2$  °C por 24 a 48 horas em jarras de anaerobiose, para bactérias lácticas. Foram selecionadas para contagem as placas contendo de 25 a 250 colônias (SWANSON et al., 2001). Os resultados foram expressos em UFC.g<sup>-1</sup>.

## 2.5. Extração e quantificação do triclosan na carne bovina

Amostras de bife foram retiradas para análise de triclosan no produto, nos tempos 0, 6, 12, 18, 24 e 30 dias de contato com o filme, para bifes embalados à vácuo e nos tempos 0, 3 e 6 dias de contato com o filme, para bifes acondicionados em bandejas de poliestireno.

A extração de triclosan das amostras de carne foi realizada segundo metodologia descrita por Silva et al. (2005). Dez gramas de amostra de carne foram imersas três vezes em 10 mL de hexano por dez minutos em agitação. As alíquotas da extração foram colocadas juntas em rotavapor (Fisatom) à vácuo para evaporação do hexano. No material gorduroso residual do balão, foram adicionados 10 mL de acetonitrila, por duas vezes, que foi evaporada à vácuo. O resíduo de extração foi diluído com 10 mL de acetonitrila, filtrado em filtro Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ , e alíquota de 100  $\mu\text{L}$  injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu 10AVP), montado com uma coluna de Shim-Pack VP-ODS (4,6  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm), bombas LC 10 AT, detector de diodo UV Shimadzu SPD-M 10 AVP. A eluição por gradiente, com fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , usou as seguintes proporções da fase móvel: tempo 0 a 2 min, acetonitrila:água (60:40); rampa: 2 a 17 min, até 100% acetonitrila; 17 a 25 min, manutenção 100% acetonitrila; rampa: 25 a 35 min, até 60% acetonitrila; tempo total de 35 minutos de corrida. A detecção foi realizada a 236 nm e o tempo de retenção foi de 8,48 minutos. A quantificação de triclosan foi realizada utilizando-se uma curva-padrão de triclosan (0 a 80  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) em hexano, em que o pico referente ao antimicrobiano foi identificado em 5,58 minutos.

#### **2.4 – Análise estatística dos resultados**

Os experimentos foram realizados em 3 repetições, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Os resultados foram analisados por meio de Análise de Variância ao nível de 5% de probabilidade e análise de regressão ao nível de 1% de probabilidade, com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as porcentagens de produto à base de triclosan adicionadas à mistura de resinas e as porcentagens incorporadas na mistura. A porcentagem incorporada equivale à concentração final do antimicrobiano nos filmes dos diferentes tratamentos.

Tabela 1 – Porcentagem de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas.

Tratamento	% adicionada na mistura	% presente nos filmes
A	0	0
B	1	0,460 ± 0,065
C	2	0,826 ± 0,075
D	3	1,080 ± 0,059

Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na porcentagem de produto à base de triclosan incorporada da mistura de resinas. Na Figura 3 está ilustrado a variação da concentração de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas. Observou-se que a concentração de produto à base de triclosan incorporada aumentou, de forma constante, em função da quantidade do antimicrobiano adicionada. Estima-se que, apenas 36% da quantidade de triclosan adicionada foi incorporada nas resinas e, portanto, está presente no filme.

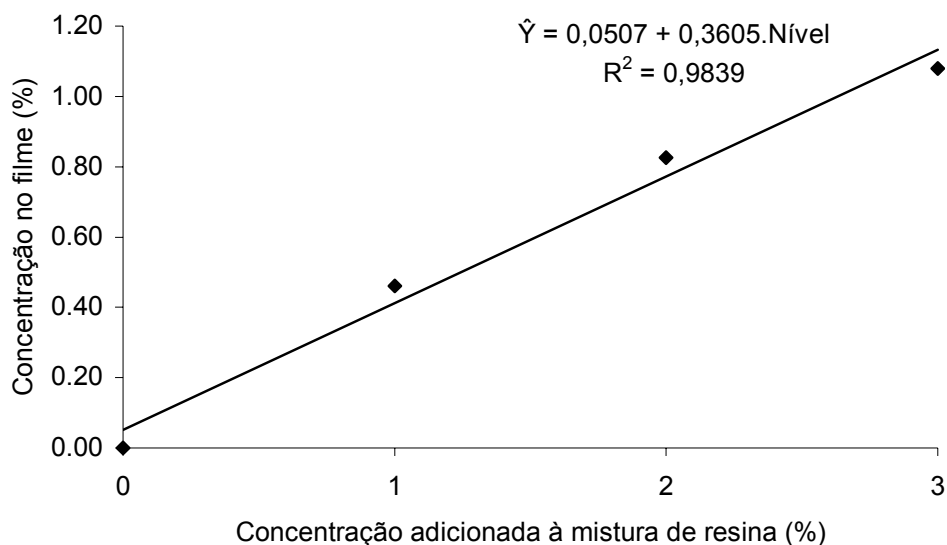


Figura 3 – Variação da concentração de produto à base de triclosan nos filmes em função da adição de diferentes concentrações do antimicrobiano na mistura de resinas.

As contagens iniciais de *Pseudomonas* sp., psicrotróficos, bactérias lácticas e enterobactérias na carne bovina são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Log UFC.g<sup>-1</sup> de *Pseudomonas* sp., psicrotróficos, bactérias lácticas e enterobactérias em carne bovina.

Microrganismo	Log UFC.g <sup>-1</sup>
<i>Pseudomonas</i> sp.	3,08
Psicrotróficos	5,89
Bactérias lácticas	2,73
Enterobactérias	3,62

Durante o período de estocagem não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na contagem de *Pseudomonas* sp. entre as carnes embaladas com os filmes dos

diferentes tratamentos, ou seja, os filmes contendo triclosan não foram eficientes para a inibição deste microrganismo na carne. Após os 6 dias de estocagem a contagem *Pseudomonas* sp. foi maior que 7,00 log UFC.g<sup>-1</sup>, contagem que caracteriza carne deteriorada. (Figura 4).

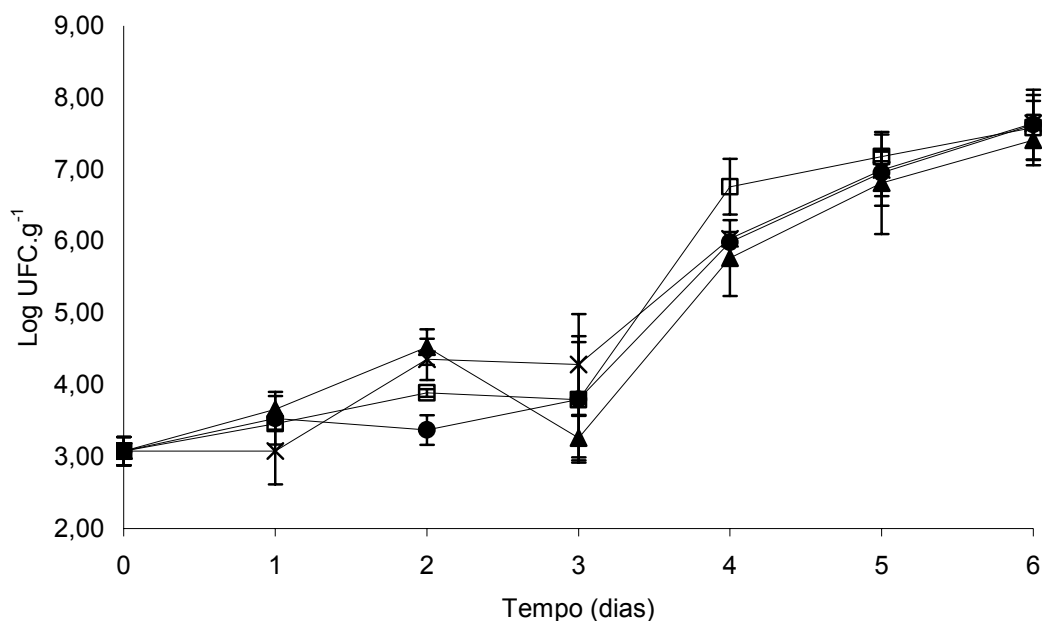


Figura 4 – Efeito dos filmes antimicrobianos sobre *Pseudomonas* sp. em carne bovina acondicionada em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC durante 6 dias de estocagem: (x) tratamento A; (●) tratamento B; (□) tratamento C e (▲) tratamento D.

Os microrganismos que normalmente deterioram carne sob refrigeração são psicrotróficos (JAMES e JAMES, 2002). O efeito antimicrobiano dos filmes sobre a contagem de psicrotróficos foi significativo ( $p < 0,05$ ) durante o período de estocagem da carne em bandejas de poliestireno. O filme do tratamento com 3% de triclosan apresentou menor contagem de psicrotróficos até o 5º dia de estocagem da carne em relação ao controle. Nos filmes dos tratamentos com 1% e 2% de triclosan, observou-se inibição do crescimento destes microrganismos até o 3º dia. Ao final dos seis dias a contagem de psicrotróficos atingiu, em média, 9,00 log UFC.g<sup>-1</sup> (Figura 5).

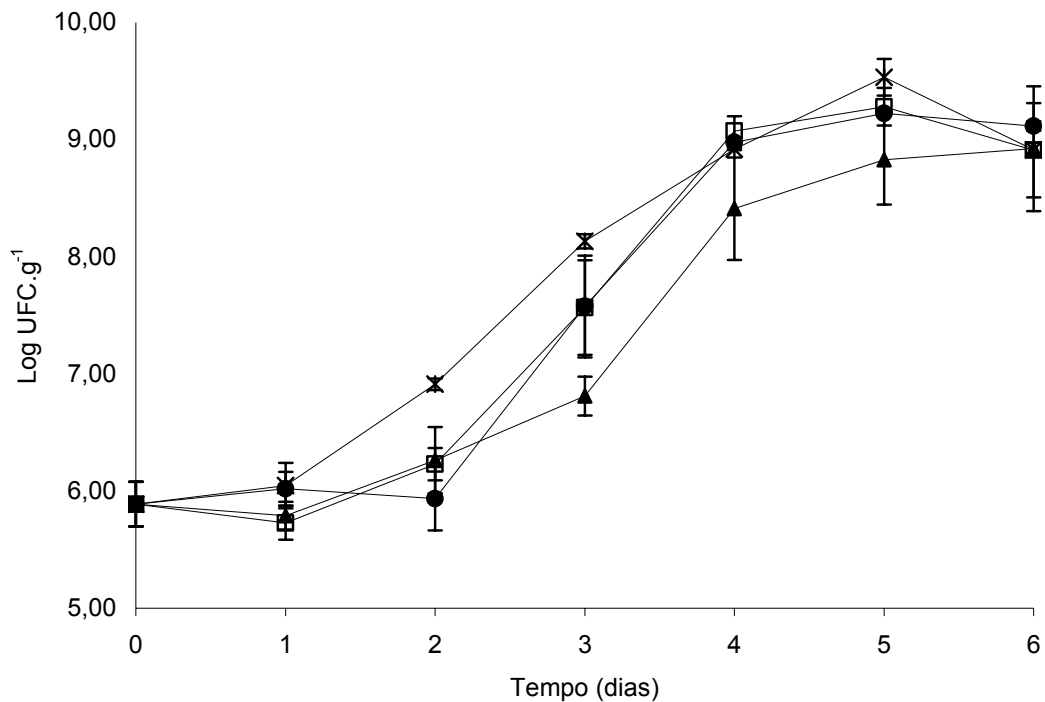


Figura 5 – Efeito dos filmes antimicrobianos sobre psicotróficos em carne bovina acondicionada em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC durante 6 dias de estocagem: (x) tratamento A; (●) tratamento B; (□) tratamento C e (▲) tratamento D.

Observou-se pequena variação na contagem de bactérias lácticas nos bifés embalados com os filmes com diferentes concentrações de triclosan, não havendo redução da contagem dessas bactérias ao longo do período avaliado (Figura 6).

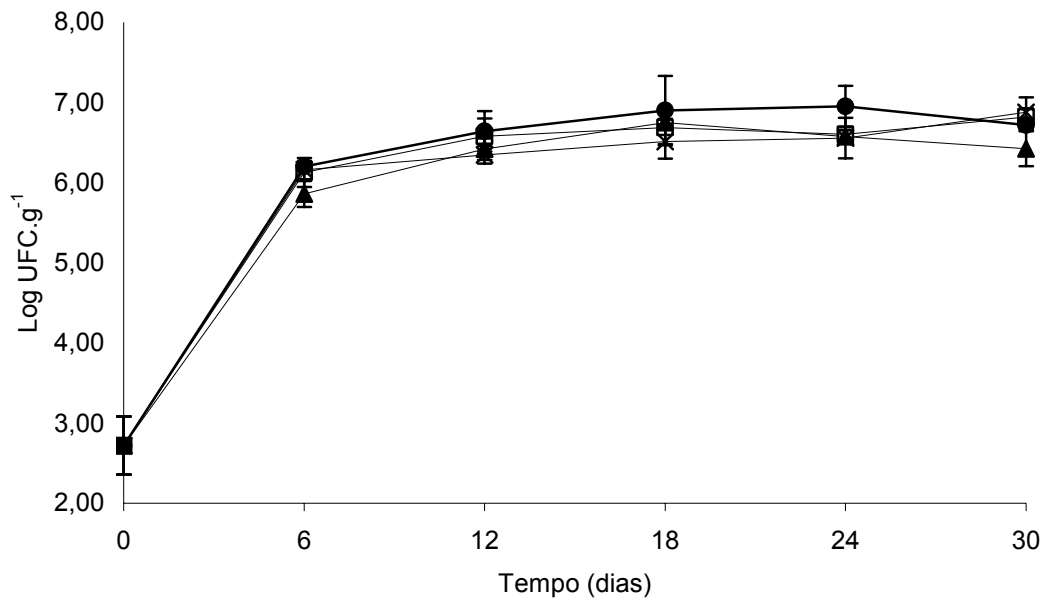


Figura 6 – Efeito dos filmes antimicrobianos sobre bactérias lácticas em carne bovina embalada à vácuo durante 30 dias de estocagem: (x) tratamento A; (●) tratamento B; (□) tratamento C e (▲) tratamento D.

Também não houve efeito antimicrobiano ( $p > 0,05$ ) dos filmes contendo triclosan sobre o crescimento de enterobactérias em carne bovina embalada à vácuo (Figura 7).

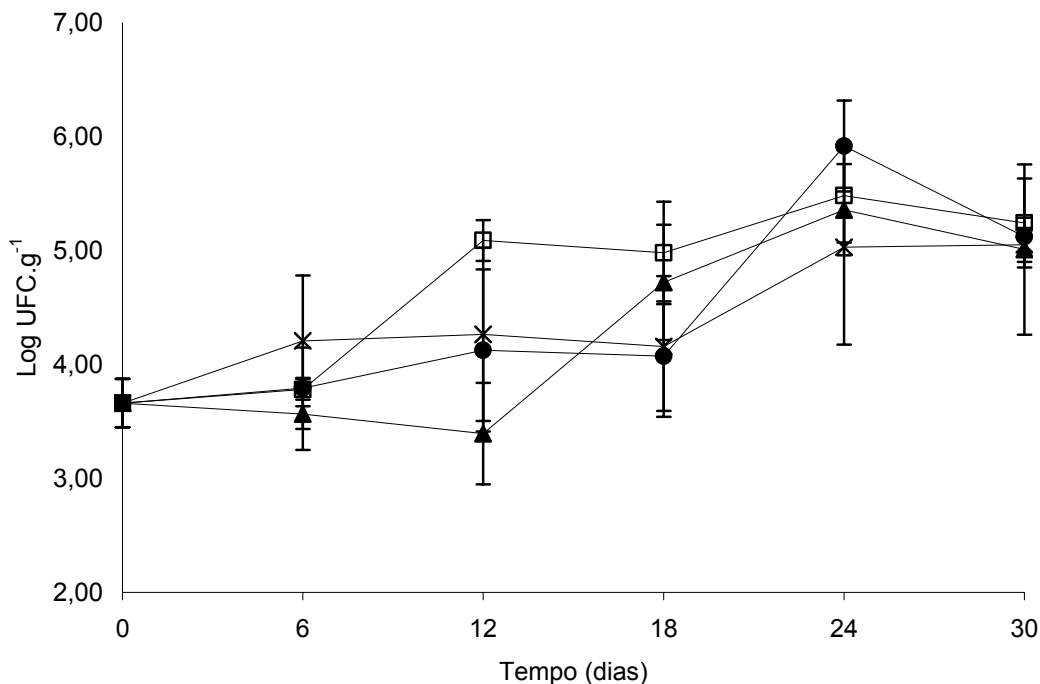


Figura 7 – Efeito dos filmes antimicrobianos sobre enterobactérias em carne bovina embalada à vácuo durante 30 dias de estocagem: (x) tratamento A; (●) tratamento B; (□) tratamento C e (▲) tratamento D.

A ineficiência dos filmes incorporados com produto à base de triclosan pode estar relacionada com a baixa qualidade da carne bovina que apresentou contagens microbianas iniciais elevadas.

CUTTER (1999), ao avaliar o efeito de plástico contendo 1500 mg.kg<sup>-1</sup> de triclosan na redução de bactérias inoculadas em carne embalada à vácuo e estocada sob refrigeração, observou que as bactérias não foram suficientemente reduzidas na superfícies da carne. Segundo o autor, a possível interação entre triclosan e compostos gordurosos pode ser responsável por esta inatividade contra bactérias na superfície de carnes.

VERMEIREN et al. (2002) avaliaram o efeito antimicrobiano de filmes de polietileno de baixa densidade contendo 0, 500 e 1000 mg.kg<sup>-1</sup> de triclosan em peito de frango embalado à vácuo e refrigerado. O estudo demonstrou que os filmes antimicrobianos não apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes*. Além disso, os filmes contendo triclosan não foram

eficientes para a redução da contagem total de aeróbios, contagem total de anaeróbios, bactérias láticas, *Enterobacteriaceae* e leveduras.

BRAID e WALE (2002), ao estudarem a eficiência de caixas plásticas incorporadas com triclosan, observaram que a ação antimicrobiana foi efetiva a 30 °C e a 22 °C, para *Escherichia coli*, mas não efetiva sob refrigeração, a 4°C, o que indicou que o efeito inibitório é dependente da temperatura. A baixa temperatura possivelmente reduz a difusão de triclosan, do filme para o produto.

A ineficiência dos filmes antimicrobianos sobre bactérias láticas, enterobactérias e *Pseudomonas* sp. em carne bovina pode ser associada à difusão insuficiente de triclosan para a inibição do crescimento desses microrganismos, bem como pela interação com compostos gordurosos presentes na carne, conforme descrito por Cutter (1999).

A eficiência dos filmes depende da difusão do antimicrobiano do filme para o alimento e, essa difusão depende de fatores como interação entre aditivo, polímero e alimentos, temperatura de estocagem, entre outros (HAN, 2003). Além disso, o antimicrobiano pode ter efeito diferente em espécies e em estirpes diferentes.

A difusão do triclosan dos filmes para a carne embalada à vácuo aumentou em função do tempo e da quantidade de triclosan presente nos filmes (Figura 8). Observou-se que quanto maior a quantidade de triclosan no filme, maior a difusão do composto para a carne e, conseqüentemente, maior a quantidade do antimicrobiano. Até o 18<sup>o</sup> dia de estocagem, a difusão do antimicrobiano foi crescente e a partir do 18<sup>o</sup> dia não houve variação na difusão. Após os 30 dias de estocagem, a maior quantidade de triclosan foi encontrada na carne em contato com o filme obtido do tratamento com 3% de triclosan que foi de 4,68 mg.kg<sup>-1</sup>, ficando abaixo do limite máximo de 5 mg.kg<sup>-1</sup>, estabelecido pelo *Scientific Committee for Food* (SFC, 2000) da Comunidade Européia. Wurlitzer (2007), ao avaliar a difusão de triclosan de filme de poli(cloreto de vinilideno) (PVdC) incorporado de 3% de triclosan para salsicha, observou que após 70 dias a quantidade máxima de triclosan encontrada em salsicha foi de

2,2 mg.kg<sup>-1</sup>, dentro do limite estabelecido pelo *Scientific Commitee for Food*. A diferença na difusão de triclosan comparada ao estudo de Wurlitzer (2007) pode ser associada ao tipo de polímero utilizado e também ao tipo de alimento em estudo.

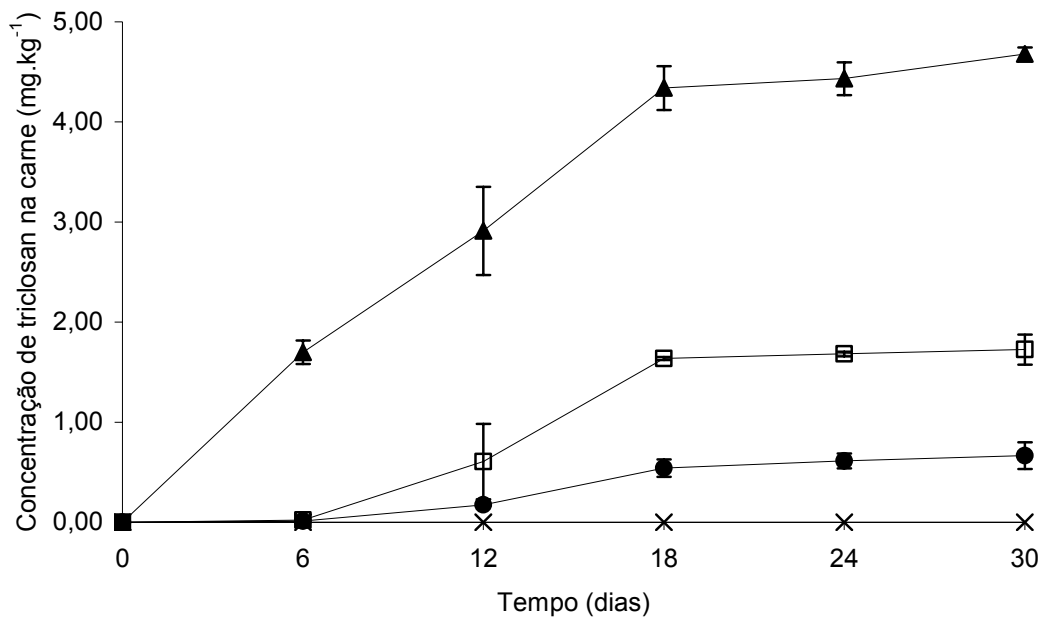


Figura 8 – Difusão de triclosan para a carne em contato com filmes e embalada à vácuo durante 30 dias de estocagem: (x) tratamento A; (●) tratamento B; (□) tratamento C e (▲) tratamento D.

A quantidade de triclosan que difundiu dos filmes para a carne embalada em bandejas de poliestireno envolvidas em PVC também variou em função do tempo de contato e da quantidade de triclosan presente nos filmes (Tabela 3). Observou-se que apenas a carne em contato com filme obtido do tratamento com 3% de triclosan, após 6 dias de estocagem, ultrapassou o limite estabelecido pelo *Scientific Commitee for Food* (SCF, 2000).

Tabela 3 – Concentração de triclosan ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) na carne em contato com os filmes e embalada em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC em diferentes tempos de estocagem.

Tempo (dias)	Tratamentos			
	A	B	C	D
0	0	0	0	0
3	0	1,47	3,15	3,97
6	0	2,81	4,13	8,75

A difusão do triclosan para a carne foi maior quando esta foi embalada em bandejas de poliestireno. A menor difusão do triclosan para a carne embalada à vácuo sugere que a interação do triclosan com a embalagem de PE/Náilon, que estava em contato com os filmes antimicrobianos em função do vácuo, foi mais favorável do que a interação entre o triclosan e a carne.

#### 4. CONCLUSÃO

Os filmes que continham triclosan permitiram inibir o crescimento de psicrotóxicos em carne bovina embalada em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC, no entanto, não foram eficientes para o controle do crescimento de *Pseudomonas* sp. Além disso, os filmes antimicrobianos também não inibiram o crescimento de bactérias lácticas e de enterobactérias presentes em superfície de bifes de carne bovina embalada à vácuo. A baixa qualidade da matéria-prima pode ter afetado a eficiência do filme antimicrobiano. Portanto, sugere-se aprofundar os estudos de avaliação da ação antimicrobiana dos filmes em carne bovina utilizando-se carne de melhor qualidade microbiológica.

A quantidade do triclosan que difundiu para a carne embalada à vácuo foi menor do que para a carne embalada em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC. Em ambas as embalagens, o filme antimicrobiano apresentou comportamento típico de embalagem ativa, pois o antimicrobiano difundiu de maneira controlada para o alimento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- AYMERICH, T.; PICOUET, P.A.; MONFORT, J.M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v. 78, p. 114-129, 2008.
- BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; MONTEIRO, A.A.; BELOTI, V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 856-862, 2007.
- BRAID, J.J.; WALE, M.C.J. The antibacterial activity of triclosan-impregnated storage boxes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Shewanella putrefaciens* in conditions simulating domestic use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2002;49:p.87-94.
- COMA, V. Perspectives for the active packaging of meat products. In: NOLLET, L.M.L., TOLDRÁ, F. (Ed.) **Advanced Technologies for Meat Processing**. Cap. 18, p. 449-472. Washington: CRC Press, 2006.
- CUTTER, C.N. The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. **Journal of Food protection**, v. 62, n. 5, p. 474-479, 1999.
- DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 21, p. 103-114, 1992.
- HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. In. AHVENAINEN, R. (Ed.) **Novel food packaging techniques**. Cap. 4, p. 50-65, Washington: CRC Press, 2003.
- HEATH, R.J.; RUBIN, J.R.; HOLLAND, D.R.; ZHANG, E.; SNOW, M.E.; ROCK, C.O. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 11110-11114, 1999.
- HEATH, R.J.; YU, Y.-T.; SHAPIRO, M.A.; OLSON, E.; ROCK, C.O. Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 30316-30320, 1998.
- JAMES, S.J.; JAMES, C. Microbiology of refrigerated meat. In. JAMES, S.J., JAMES, C (Eds.) **Meat refrigeration**. Cap. 1. p. 3-19, Washington: CRC Press, 2002.

LEGNANI, P.; LEONI, E.; BERVEGLIERI, M.; MIROLO, G.; ALVARO, N. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. **Food Control**, v. 15, p. 205-211, 2004.

LEVY, C.W.; ROUJEINIKOVA, A.; SEDELNIKOVA, S.; BAKER, P.J.; STUITJE, A.R.; SLABAS, A.R.; RICE, D.W.; REFFERTY, J.B. Molecular basis of triclosan activity. **Nature**, v. 398, p. 383-384, 1999.

McMURRY, L.M.; OETHINGER, M.; LEVY, S.B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, p. 531-532, 1998.

OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, P.A.P.L.V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, p. 161-165, 2004.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIERI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5598–5605, 2004.

PIRES, I.S.C.; COSTA, N.M.B.; ROSADO, G.P.; OLIVEIRA, R.S.; MONTEIRO, J.B.R. Qualidade protéica da carne de novilho precoce alimentado com lipídios protegidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 799-804, 2006.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 373-380, 2002.

SALLAM, K.I.; SAMEJIMA, K. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 865-871, 2004.

SCF. Opinion of the Scientific Committee on Food on the 10 th additional list of monomers and additives for food contact materials. Adopted by the SCF on 22/6/2000. CS/PM/GEN/M82 final, 11 July 2000. Disponível: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out62\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out62_en.pdf). Acesso em: 05/04/2008.

SILVA, A.S.; GARCÍA, R.S.; HERNÁNDEZ, J.L.; LOSADA, P.P. Determination of triclosan in foodstuffs. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 1, p. 65-782, 2005.

SULLER, M.T.E.; RUSSELL, A.D. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 11-18, 2000.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Cap. 6, p. 53-62, 4.ed, Washington: APHA, 2001.

THOMAS, J. Microbiological and Sensory Properties of Beef. In: NOLLET, L.M.L. (Ed.) **Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality**. Cap. 25, p. 333-340, Blackwell Publishing, 2007.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEVEBERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 163-171, 2002.

WURLITZER, N.J. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli(cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan**. 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

## CONCLUSÃO GERAL

A adição de triclosan nos filmes de polietileno de baixa densidade não alterou suas propriedades físicas, mecânicas e microscópicas.

Os filmes incorporados com triclosan apresentaram eficiência antimicrobiana em meio de cultura.

*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua* e *Salmonella choleraesuis* foram mais resistentes à ação do triclosan do que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A concentração mínima inibitória do triclosan para *S. aureus* e *E. coli* foi baixa, no entanto, após sucessivas exposições ao antimicrobiano, ambos os microrganismos adquiriram resistência ao triclosan.

Os filmes antimicrobianos inibiram o crescimento de psicrotróficos, mas não foram eficientes contra *Pseudomonas* sp. na carne bovina embalada em bandejas de poliestireno envolvidas com PVC. Os filmes também não apresentaram eficiência antimicrobiana contra bactérias lácticas e enterobactérias na carne bovina embalada à vácuo.

Estudos mais aprofundados visando avaliar a eficiência de filmes ativos incorporados com triclosan na conservação de alimentos devem ser realizados, uma vez que a realização de *testes in vitro* não representam as condições reais dos alimentos, pois utilizam meios de cultura e culturas puras e, a ação antimicrobiana do triclosan pode ser diferente para espécies e estipes variadas.

## **ANEXOS**

Tabela 1 – Resumo da análise de regressão para a concentração de triclosan incorporada nos pellets após os tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Regressão	1	1.9494*
Falta de ajuste	2	0.0320 <sup>n.s</sup>
Tratamentos	(3)	1.9814
Resíduo	8	0.0267

\* significativo a 1% de probabilidade. QM = quadrado médio.

<sup>n.s</sup> não significativo a 1% de probabilidade

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para espessura dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	6,8542 <sup>n.s</sup>
Resíduo	8	6,7083

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para carga máxima na ruptura dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	4,5888 <sup>n.s</sup>
Resíduo	8	1,5092

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância para porcentagem de alongamento na ruptura dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	62544,5519 <sup>n.s</sup>
Resíduo	8	25606,1058

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para taxa de transmissão ao vapor de água dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	0,3524 <sup>n.s</sup>
Resíduo	8	0,4444

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 6 – Resumo da análise de variância para taxa de transmissão ao oxigênio dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	11055,4160 <sup>n.s</sup>
Resíduo	8	5215,1616

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para diâmetro dos halos de inibição para *Escherichia coli* formados pelos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	7,6313*
Resíduo	8	0,0810

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 8 – Resumo da análise de variância para diâmetro dos halos de inibição para *Staphylococcus aureus* formados pelos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	6,7169*
Resíduo	8	0,0177

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 9 – Resumo da análise de variância para o log decimal da contagem de bactérias lácticas em carne bovina em contato com os filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan, durante o período de estocagem.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	0,1730*
Tempo	5	29,7934*
Tratamento*Tempo	15	0,0521 <sup>n.s</sup>
Resíduo	48	0,0524

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 10 – Resumo da análise de variância para o log decimal da contagem de enterobactérias em carne bovina em contato com os filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan, durante o período de estocagem.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	0,5749 <sup>n.s</sup>
Tempo	5	5,9378*
Tratamento*Tempo	15	0,4207*
Resíduo	48	0,2128

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 11 – Resumo da análise de variância para o log decimal da contagem de *Pseudomonas* sp. em carne bovina em contato com os filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan, durante o período de estocagem.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	0,2053 <sup>n.s</sup>
Tempo	5	40,7460*
Tratamento*Tempo	15	0,3292*
Resíduo	48	0,1681

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

<sup>n.s</sup> não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 12 – Resumo da análise de variância para o log decimal da contagem de psicrotróficos em carne bovina em contato com os filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan, durante o período de estocagem.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	0,8414*
Tempo	5	26,8465*
Tratamento*Tempo	15	0,1961*
Resíduo	48	0,0590

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.

Tabela 13 – Resumo da análise de variância para a difusão de triclosan dos filmes obtidos dos tratamentos com diferentes concentrações de triclosan para a carne bovina em contato com os filmes, durante o período de estocagem.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
Tratamentos	3	32.7763*
Tempo	5	6.5909*
Tratamento*Tempo	15	2.0662*
Resíduo	48	0.0203

\* significativo a 5% de probabilidade. QM = quadrado médio.