



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MANUELA MONTESSO LISBOA

**INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE ÁCIDOS NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS E DE BARREIRA DE PELÍCULAS COMESTÍVEIS
DE ALGINATO.**

Maringá - Pr
Agosto - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MANUELA MONTESSO LISBOA

**INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE ÁCIDOS NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS E DE BARREIRA DE PELÍCULAS COMESTÍVEIS
DE ALGINATO.**

-

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá, como parte
dos requisitos necessários à obtenção do Grau
de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mônica Regina da Silva
Scapim

Maringá - Pr
Agosto - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Manuela Montesso Lisboa perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos em 31 de agosto de 2019.

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Mônica Regina da Silva Scapim, DSc
Orientador^a

Prof^a. Grasielle Scaramal Madrona, DSc
Membro

Prof^a. Lucinéia Cestari Tonon, Dsc
Membro

-

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino, meu guia e socorro presente na hora da angústia. Aos meus pais Cacilda e Roberto, meus irmãos Gabriela e Rômulo, meu cunhado Fabrício e sobrinho Isaias, mas em especial a minha mãe, que com todo seu amor e carinho não mediu esforços para que eu chegasse até aqui.”

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer primeiramente a querida professora Mônica, que com sabedoria conduziu toda a pesquisa, agradeço pela orientação, carinho, motivação e incentivo.

A amiga Ana Carolina Castilho por todo incentivo, carinho e amizade durante todo o mestrado.

A amiga Camila Marinho, que foi de total importância na elaboração das análises.

As amigas Cindy, Mariana e Joice, por todo auxílio e ajuda despendida ao longo das análises e mestrado.

A professora Lucinéia Cestari Tonon, por toda ajuda e ensino nas análises.

A Prof^a. Dra. Jane Martha Graton Mickcha pela disponibilidade e ajuda nas análises microbiológicas

Aos colegas Alex, João Vitor e Andréia por toda ajuda com as análises microbiológicas.

Aos meus pastores Diogo e Lisandra por serem grandes incentivadores e amigos, a célula Só Vai e aos meus amigos e líderes Abraão e Rafaela, que muitas vezes orou por mim, e me incentivou a continuar.

Ao Colégio Estadual Polivalente, toda equipe diretiva, os professores e alunos do Curso Técnico em Alimentos, que não mediram esforços, incentivo e amizade para que o trabalho fosse realizado com excelência.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos pela disponibilização do material necessário para as análises.

Agradeço ao departamento de Engenharia de Alimentos pela disponibilização do material necessário para as pesquisas técnicas.

“Para onde poderia eu escapar do teu Espírito? Para onde poderia fugir da tua presença?” Salmos 139:7

RESUMO

LISBOA, Manuela Montesso. Interferência de diferentes tipos de ácidos nas propriedades mecânicas e de barreira de películas comestíveis de alginato. 2019. 50f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2019.

O uso de revestimento comestível apresenta-se como uma opção para melhorar a qualidade e aumentar o tempo de prateleira. A terapia fotodinâmica e a adição de ácido pode ser outra opção que diminui o número de células viáveis de microrganismos, inclusive de *Gram-negativas*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação de coberturas comestíveis que tenha capacidade de inibir o crescimento de *Escherichia Coli*, usando pH ácido submetido a aplicação de terapia fotodinâmica, com a finalidade de aumentar a vida de prateleira de queijos frescos. Para isso, foram elaboradas películas com a adição de ácidos láctico, málico e cítrico. A micrografia da superfície da película controle apresentou manchas, já a formação de cristais foi aparentemente acentuada pela presença de ácido cítrico e málico, o que não foram observados nos filmes controle e na película com ácido láctico. A micrografia de superfície do filme de alginato com ácido láctico mostrou maior homogeneidade, sem manchas e rachaduras. Após a análise in vitro, obteve-se que o melhor resultado na análise de sobrevivência das bactérias, foi a película com adição de ácido cítrico, que eliminou a E.Coli na presença de Luz, e teve o menor resultado sem a presença de Luz.. A película aplicada ao queijo fresco diminuiu a contagem microbiológica nos primeiros 7 dias, obtendo menor perda de massa; acidez e pH controláveis além, da oxidação lipídica que se manteve dentro do esperado.

Palavras-chave: Filmes biodegradáveis; conservação de queijos; embalagens ativas.

ABSTRACT

LISBOA, Manuela Montesso. Interference of different types of acids on the mechanical and barrier properties of edible alginate films. 2019. 50f. Dissertation (Master in Food Engineering) - Postgraduate Program in Food Engineering. Maringá State University. Maringa, 2019.

The use of edible coating is an option to improve quality and increase shelf life. Photodynamic therapy and acid addition may be another option that decreases the number of viable cells of microorganisms, including gram-negative ones. The objective of the present work was to evaluate the application of edible toppings capable of inhibiting the growth of *Escherichia Coli*, using acidic pH submitted to photodynamic therapy, with the purpose of increasing the shelf life of fresh cheese. For this, films were prepared with the addition of lactic, malic and citric acids. The micrograph of the surface of the control film showed spots, while crystal formation was apparently accentuated by the presence of citric and malic acid, which were not observed in control films and lactic acid film. Surface micrograph of lactic acid alginate film showed greater homogeneity, without staining and cracking. After the *in vitro* analysis, it was found that the best result in the bacterial survival analysis was the citric acid added film, which eliminated *E. coli* in the presence of light, and had the lowest result without the presence of light. The film applied to fresh cheese decreased the microbiological count in the first seven days, obtaining less mass loss; controllable acidity and pH, the lipid oxidation that remained within the expected range.

Keywords: Biodegradable films; cheese preservation; packaging.

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de Filmes e Coberturas Biodegradáveis	17
Figura 2 – Estrutura química da eritrosina	21
Figura 3 – Micrografias da superfície dos filmes alginato com eritrosina e ácido.....	34
Figura 4 – Micrografias da borda de corte dos filmes alginato com eritrosina e ácido.	35

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de matérias-primas para produção de filmes e coberturas biodegradáveis	16
Tabela 2 – Resultados da Tração na Ruptura, Alongamento e Módulo de Young das películas de alginato com eritrosina com e sem a adição de ácido.....	31
Tabela 3 – Permeabilidade ao vapor de água das películas de alginato com eritrosina com e sem a adição de ácido.	33
Tabela 4 – Valores médios para análise <i>in vitro</i> de diferentes películas na inibição do crescimento de <i>E. Coli</i> (log UFC /g)	36
Tabela 5 – Valores médios para contagem do número de células de <i>E. Coli</i> (ATCC 25922) em ricotas adicionada de películas com alginato e diferentes combinações de ácidos e tratamento TFD	37
Tabela 6 – Valores médios para taxa de Oxidação Lipídica ao longo dos dias e diferentes tratamentos na composição do queijo	38
Tabela 7 – Valores médios para perda de massa de amostras de ricota armazenada a 5°C ao longo de 28 dias.	39
Tabela 8 – Valores médios para análise de acidez de amostras de ricota armazenada a 5°C ao longo de 28 dias.	40
Tabela 9 – Valores médios para análise de pH de amostras de ricota armazenada a 5°C ao longo de 28 dias.	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Coberturas comestíveis	16
3.2 Conservação de queijos	17
3.3 Terapia Fotodinâmica	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Elaboração das coberturas	23
4.1.1 Espessura	24
4.1.2 Propriedades Mecânicas	24
4.1.3 Permeabilidade ao Vapor de Água	25
4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	25
4.1.5 Análise microbiológica in vitro	26
4.2 Aplicação da Cobertura em Queijo fresco e Avaliação de Vida de prateleira	27
4.2.1 Preparo do inóculo	28
4.2.2 Aplicação da Terapia Fotodinâmica	28
4.2.3 Análise microbiológica das amostras de queijo	28
4.2.4 Análise da oxidação lipídica das amostras de queijo	29
4.2.5 Análise da perda de massa das amostras de queijo	29
4.2.6 Análise de Acidez e pH	29
4.3 Análise Estatística	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Propriedades Mecânicas	31
5.2 Permeabilidade ao Vapor de Água	32
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	33
5.3 Análise microbiológica in vitro	35
5.4 Análise microbiológica das amostras de queijo	36
5.5 Análise de Oxidação lipídica	38
5.6 Análise de perda de massa	39

5.7 Análise de acidez e pH	40
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A produção de películas comestíveis para diminuição do impacto ambiental tem despertado interesse em função das suas potenciais aplicações, como a habilidade de funcionar como suporte de substâncias ativas para liberação controlada (antioxidantes, agentes antimicrobianos, quelantes, etc) (TURBIANI, KIECKBUSCH, 2011).

A aplicação de coberturas é uma técnica promissora, pois não proporciona alterações nos aspectos de qualidade, além de ser atóxico e biodegradável (OLIVEIRA, 2015).

A escolha da composição da cobertura a ser aplicada nos alimentos deve avaliar quais barreiras devem ser colocadas, a estabilidade da película formada, facilidade de aplicação, custos e outros. As propriedades de permeabilidade de filmes e coberturas comestíveis a gases são de grande interesse para a definição da aplicação mais adequada, por exemplo, barreiras ao oxigênio podem proteger alimentos que são sujeitos à oxidação (CUQ *et. al.*, 1995).

A utilização de Tecnologia de Métodos Combinados na conservação de alimentos tem sido baseada na aplicação de tecnologias simples que utilizam uma combinação de dois ou mais fatores de conservação, promovendo a estabilidade do alimento durante o armazenamento (AZEREDO & JARDINE, 2000). Além dos procedimentos naturais de conservação como calor do sol, frio do inverno ou do próprio gelo, fumaça do fogão ou das lareiras, a tecnologia de alimentos herdou do passado determinados processos físico-químicos ou biológicos, tais como secagem, salga, cristalização, fermentação, etc. que permitem aumentar a vida útil dos produtos alimentícios em dias, meses ou anos. Na realidade, a maioria dos alimentos é conservada pela utilização de métodos mistos, porém, na prática, costuma-se citar apenas o mais importante dentre os que foram empregados (EVANGELISTA, 2000).

O queijo é um dos alimentos mais consumidos pelo homem, e considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite contaminado e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria,

pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA *et. al.*, 2003).

Nos últimos anos, os microrganismos patogênicos como os *Coliformes* deteriorantes, têm sido frequentemente encontrados em amostras de queijo, colocando em risco a saúde da população (GARCIA *et. al.*, 2017)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica fotoquímica utilizada com o objetivo de causar destruição seletiva de células a qual envolve a utilização de um fotossensibilizante (corante ou pigmento) seguida da irradiação de uma luz visível. Os fotossensibilizantes são ativados pela luz, transferindo energia ao oxigênio molecular, onde irá gerar espécies reativas de oxigênio, induzindo a morte celular (KURWA, BARLOW, 1999).

Após estudos (MIAZAKI, 2018), verificou-se que somente a fotodinâmica não era eficaz na eliminação de microrganismos como *E. Coli*. Já Ghate *et. al.*, (2015), demonstraram através de experimentos, que a utilização de Luz, mais diminuição do pH, através da utilização de ácidos orgânicos como o ácido cítrico, láctico e málico conseguiram eliminar significativamente a *E. Coli*.

As bactérias Gram negativas, como a *E. Coli*, demonstram uma certa resistência a Terapia Fotodinâmica, pois sua parede celular é bastante complexa com duas biocamadas lipídicas - membrana citoplasmática, uma camada fina de peptidoglicanos e uma membrana externa (DAMANTE, 2015). Por isso a utilização desses ácidos provocam um efeito antibacteriano, como resultado de sua capacidade de penetrar na membrana celular e diminuir o pH intracelular, e romper a estrutura da membrana celular (GHATE *et al.* 2015).

Por isto, a utilização da Fotodinâmica, a eritrosina e a diminuição do pH foram escolhidos para eliminar a *E. Coli* de queijos tipo ricota na presente pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

✓ Avaliar a aplicação de coberturas comestíveis a fim de prolongar a vida útil da ricota com capacidade de inibir o crescimento de *Escherichia Coli*, usando ácido, eritrosina e submetidos a aplicação de terapia fotodinâmica.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Elaborar coberturas comestíveis com pH ácido, utilizando ácido láctico, málico e cítrico.
- ✓ *Verificar a Interferência da diminuição do pH no comportamento das coberturas comestíveis.*
- ✓ Avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica com coberturas comestíveis ácidas em queijos inoculados com células de *E. Coli*.
- ✓ Analisar as características físico-químicas do queijo adicionado de coberturas comestíveis acidificadas.
- ✓ Verificar a perda de massa do queijo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Coberturas comestíveis

Para desenvolver embalagens para alimentos verifica-se a proteção e qualidade do produto, higiene, conveniência e facilidade para o transporte e manipulação e, além disso, o seu desenho deve satisfazer as necessidades e desejos do consumidor garantindo sempre sua saúde e segurança (COLES, MCDOWELL, KIRWAN 2003).

É necessário pesquisar novas fontes de materiais compostáveis, biodegradáveis ou comestíveis que tenham propriedades funcionais semelhantes as embalagens plásticas, possibilitando assim a substituição destes materiais (Tabela 1). Entende-se por materiais biodegradáveis aqueles que podem ser transformados em biomassa, dióxido de carbono e água por microrganismos presentes (não adicionados), como bactérias, algas ou fungos (SERNA, 2015).

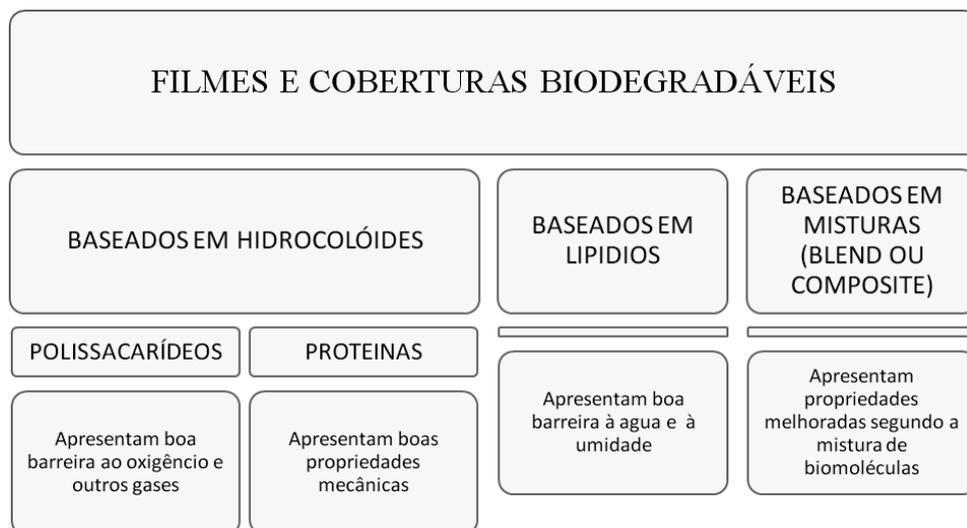
Tabela 1 – Exemplos de matérias-primas para produção de filmes e coberturas biodegradáveis

Matéria Prima	Fonte	Substância Extraída
Soro de Leite	Resíduo da indústria de leite	Proteína de Soro
Milho, Trigo, Mandioca	Grãos, Mostarda	Amido
Milho	Coproduto de Moagem	Zeína
Esqueleto de Crustáceos	Resíduo da indústria de camarão	Quitossana
Pele, Ossos	Indústria de Carne e Peixes	Colágeno e Gelatina
Arvores	Resíduo da indústria de madeira, papel	Celulose e Derivados
Trigo	Grão	Glúten de Trigo
Soja	Grão	Extrato de proteína de soja

Casca de frutas cítricas	Resíduo da indústria de suco, polpa e frutas	Pectina
Sementes Oleaginosas	Produto da indústria de óleos	Triglicerídeos, Ácidos graxos

Fonte: SERNA (2015)

Os efeitos das coberturas comestíveis dependem da composição da cobertura. O desenvolvimento dos filmes e coberturas comestíveis está focado em formar barreiras contendo proteínas, polissacarídeos e lipídeos (PEREZ-GAGO *et. al.*, 2006). As coberturas e filmes são classificados de acordo com cada biomolécula utilizada para o seu preparo (Figura 1):



Fonte: SERNA (2015)

Figura 1 - Classificação de Filmes e Coberturas Biodegradáveis

3.2 Conservação de queijos

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e B. É um dos alimentos mais nutritivos que se conhece. Os minerais participam do processo de coagulação do leite, influenciando a textura do queijo (PERRY, 2004).

Segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), queijo é o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro

do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Queijo fresco é aquele que está pronto para o consumo logo após sua fabricação.

A boa qualidade microbiológica do leite, seja ele pasteurizado ou cru, é fundamental para a preparação de bons queijos. Ela pressupõe um gado saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios ue, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4 °C, atingindo esta temperatura no máximo 3 h após a ordenha. Essas práticas permitem que o leite mantenha a qualidade microbiológica por até 48 h, mas não significam ausência de bactérias. Inclusive porque o leite é um ótimo meio para crescimento destes microrganismos (BRASIL, 2018).

Para Silva *et. al.* (2017), o queijo faz parte da alimentação de todas as classes sociais, sendo um dos alimentos mais consumidos na dieta humana. Por ser um alimento rico em nutrientes e perecível, principalmente os tipos frescos, os queijos podem veicular diferentes tipos de patógenos como os Coliformes totais e os termotolerantes, sendo que a presença destes microrganismos podem ser utilizados como indicadores da falta de qualidade do produto, de acordo com a presença e quantidade no queijo (SILVA, CAVALLI, OLIVEIRA, 2006).

A *E. Coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, sendo uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É isolada com frequência em alimentos e em produtos lácteos, incluindo os armazenados sob-refrigeração (CAMPOS *et. al.*, 2006).

Segundo Chioda *et. al.* (2007) estudos com queijo “Minas Frescal” têm permitido o isolamento de diversos patógenos de importância em Saúde Pública, destacando-se a *Escherichia Coli*. Sendo estas responsáveis por “doenças microbianas de origem alimentar” ou “toxinfecções alimentares”. A *Escherichia Coli* enterotoxigênica é a causa comum de “diarreia de viajante”. Algumas cepas, ao serem ingeridas com alimentos, multiplicam-se no intestino e produzem toxinas que originam hipersecreção no intestino delgado; a luz intestinal é distendida pelo líquido, provocando hipermotilidade e diarreia que duram alguns dias (1 a 3 dias). O

período de incubação é de 24 a 72 horas. Ocorre diarreia, vômitos, mas não apresenta quadro febril (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

As indústrias têm implantado mecanismos para conservar e prolongar a vida de prateleira dos alimentos. Entretanto, apesar dos alimentos estarem aparentemente higiênicos e saudáveis, o risco de toxinfecção alimentar é frequente, o que tem transformado o consumidor cada vez mais exigente em relação ao uso correto e seguro dos aditivos e conservantes.

As Toxinfecções Alimentares (TIA's) podem ser resultantes da conservação e manipulação incorretas. A etapa onde ocorre a contaminação dos alimentos, ou seja, a qual o agente contaminante sobrevive ou se multiplica é dependente de uma série de variáveis. A identificação da causa que levou o microrganismo a sobreviver e se multiplicar no alimento, é de fundamental importância para a adoção de medidas preventivas no que se refere ao comércio de alimentos (MURMANN, MALLMANN E DILKIN, 2005).

Os processos de conservação de alimentos são baseados na eliminação total ou parcial dos agentes que alteram os produtos, sejam os de natureza biológica (microrganismos), sejam os de natureza química (enzimas). Consistem na aplicação de alguns princípios físicos ou químicos tais como: uso de altas e baixas temperaturas, eliminação de água, aplicação de aditivos, conservantes, armazenamento em atmosfera controlada, uso de certas radiações e filtração. Os diversos processos podem ser aplicados em extremos de escalas de tecnologia e custos, com muito bons resultados (BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N., 1998).

A fim de evitar o aparecimento de microrganismos indesejáveis, Pagani *et. al.*, (2013) destaca a importância da aplicação de técnicas de conservação microbiológica em queijos, sendo a utilização dos revestimentos comestíveis uma alternativa utilizada pelas indústrias para incluir conservantes nos alimentos.

O consumidor tem procurado por qualidade, e o conjunto de atributos que tratam a qualidade faz com que seja o escolhido, exigindo sempre a inocuidade e segurança alimentar. Com isso, a higiene alimentar procura conservar e promover segurança alimentar e nutricional, assegurando a inocuidade e sanidade dos alimentos (SILVA *et. al.*, 2017).

Assim, o emprego das Boas Práticas de Fabricação (BPF) associado a novas tecnologias de conservação microbiológica tornam-se essenciais, com a

finalidade de aprimorar a qualidade e estabilidade microbiológica de produtos processados como o queijo de coalho (OLIVEIRA, MACHADO E BENTO, 2015).

3.3 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (FTD) possui diversas vantagens na fotoinativação de microrganismos, pois tem efeito rápido, é altamente localizado, além de permitir a eliminação de microrganismos em vários meios e superfícies (BERTOLONI *et. al*, 1984).

Como absorvem luz com elevada eficiência, em alguma região do espectro visível, alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de certas reações fotoquímicas específicas, sugerindo que corantes (Figura 2) excitados por aplicação de luz teriam efeitos destrutivos em sistemas biológicos (ACROYD *et. al*, 2001).

A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana para os diferentes microrganismos depende tanto do tipo quanto da concentração do fotossensibilizador, além do modo exato de ação do fotossensibilizador que por sua vez, é influenciado pelo sítio de ação (MELO, PERUSSI, 2012).

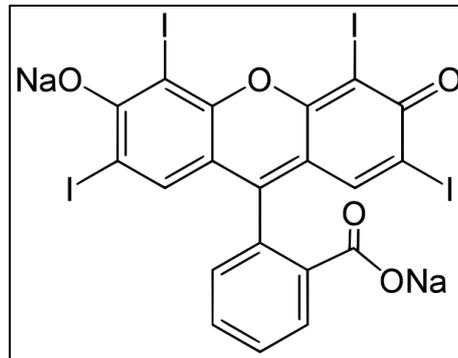
Um estudo realizado por Ghate *et. al.* (2015), mostrou que os ácidos orgânicos encontrados nos alimentos ou frequentemente usado para a conservação de alimentos, aumentaram a eficácia dos LEDs frente aos patógenos veiculados por alimentos testados.

Oliveira *et. al.*(2018), estudaram a eficiência da curcumina, aplicação da fotodinâmica e diminuição de pH, e obtiveram resultados na diminuição de *E. Coli*, independente da temperatura, podendo ser utilizado em produtos sob refrigeração, como por exemplo o queijo fresco.

3.3 Eritrosina

A eritrosina B é um xanteno caracterizado por uma forte absorção de luz no espectro gama de 500-550nm, e apresenta a capacidade de iniciar conseqüentes reações fotoquímicas. A eritrosina B, também é um corante de origem sintética que

apresenta coloração rósea (ANASTÁCIO et al., 2016). Possui propriedades genotóxicas (SARIKAIA, SELVI, ERKOÇ, 2012) e citotóxicas (CHEQUER *et. al.*, 2012), potencial antimicrobiano em terapia fotodinâmica (YASSUNAKA *et. al.*, 2015). Na Figura 2, podemos ver a estrutura química do fotossensibilizador da eritrosina.



Fonte: ALBUQUERQUE *et. al.*, 2012.

Figura 2 – Estrutura química da eritrosina

Os corantes são alguns dos aditivos mais empregados na indústria alimentícia. A modificação da cor natural do alimento constitui se em um fator fundamental para que este seja melhor aceito pelo mercado consumidor. Antes do paladar, os alimentos coloridos seduzem as pessoas pela visão, uma vez que a lógica do consumo desses produtos inicia-se pelos atrativos visuais. Em geral, a importância da aparência do produto para sua aceitabilidade é a maior justificativa para o emprego de corantes (ANASTÁCIO et al., 2016).

A Eritrosina é um corante artificial sintetizado a partir da tinta do alcatrão, utilizado para conferir coloração a grande variedade de produtos, como bebidas, biscoitos, doces, produtos de padaria, produtos cárneos, chicletes e sorvetes (SPELLMEIER, STÜLP, 2009).

A eritrosina, também é um corante que apresenta coloração rósea. É regulamentada no Brasil pela ANVISA, desde o ano de 1977 sendo, atualmente, legalizada para uso industrial no país. Também tem sido descrito na literatura como potencial antimicrobiano em terapia fotodinâmica (ANASTÁCIO et al., 2016).

Yassunaka *et. al.* (2015), descreveram como os fotossintetizantes (PS) ou corantes são ativados. Eles são ativados por irradiação de luz em presença de oxigênio, induzindo à produção de espécies altamente reativas de oxigênio – que detém potencial causador de danos aos organismos microbianos. A eficácia da

técnica é atribuível a vários fatores, tais como a estrutura celular, a organização, o estado fisiológico das bactérias, o grau de ligação e de penetração do PS nas bactérias, e as propriedades físico-químicas do PS.

A técnica combinada de Luz + fotossensibilizador, mostra-se eficaz contra inúmeros microrganismos como bactérias gram-positivas, gram-negativas, suas respectivas formas vegetativas, esporos, fungos, vírus e protozoários; bem como organismos patogênicos e bactérias de deterioração alimentícia (ALBUQUERQUE *et. al.*, 2012). Após diversos estudos, Yassunaka *et. al.* (2015) mostraram que a característica molecular da Eritrosina B detém elevada capacidade fotodinâmica e diversas concentrações do corante, incluindo seus derivados, reduziram de maneira eficaz a sobrevivência bacteriana; dentre elas a *S. aureus* e a *E. Coli*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Elaboração das coberturas

A elaboração das coberturas e análises foram realizadas no Laboratório de Embalagens do Departamento de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Maringá.

Para produção das películas, foram utilizadas: 200mL de H₂O, 4 gramas de Protanal sf120rb (alginato), 0,8% de Cloreto de Cálcio, 2mL de Glicerol, 100 µMol de Eritrosina. Foram produzidas 4 tipos de películas, uma padrão, e outras três, onde uma possuía 0,14 gramas de ácido cítrico, 0,15 ácido málico, e outra com 2mL de ácido láctico. O pH final de ambas as soluções contendo ácido foi de 4,5.

As películas com ácido foram produzidas da seguinte forma:

- Alginato + Água + Eritrosina + Glicerol + Cloreto de Cálcio
- Alginato + Água + Ácido Cítrico + Eritrosina + Glicerol + Cloreto de Cálcio
- Alginato + Água + Ácido Láctico + Eritrosina + Glicerol + Cloreto de Cálcio
- Alginato + Água + Ácido Málico + Eritrosina + Glicerol + Cloreto de Cálcio

Para produção das películas com ácido pesou-se 4 gramas de alginato, onde o volume de 200 mL foi completado com água destilada, a solução foi aquecida até 70°C para facilitar na dissolução do alginato, com auxílio de agitador magnético a 10rpm, por aproximadamente 20 minutos, até completa dissolução do alginato (GROPPO *et al.*, 2009). O valor de pH da solução foi medido e adicionou-se ácido (Láctico, Málico ou Cítrico) até que o pH atingisse 4,5. Após esta etapa, adicionou-se 2mL de glicerol, 100µMol de Eritrosina, e 15 mL de Cloreto de Cálcio a 0,8%. Após a solução estar totalmente dissolvida, a mesma foi colocada em ultrassom por 30 minutos para retirada das bolhas de ar, formadas no processo de agitação. O volume de 200 mL da solução foi vertido em placa de acrílico quadradas de 18x18 cm, e acondicionadas por aproximadamente 18 horas em estufa com circulação de ar a 50° C (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

As películas foram caracterizadas quanto a: Espessura, Propriedades mecânicas, Permeabilidade ao vapor d`água e microscopia eletrônica de varredura.

4.1.1 Espessura

A espessura foi determinada através de um micrômetro digital com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm. Todas as medidas foram avaliadas em triplicata.

4.1.2 Propriedades Mecânicas

As películas foram cortadas em retângulo com 1cm de largura e 8cm de comprimento, foram condicionadas em umidade relativa de 53% por 72 horas. As propriedades de tração foram determinadas usando um analisador de textura TAXT2i Stable Micro System (Surrey, Inglaterra) de acordo com ASTM D - 882 - 91 (1995). As amostras foram colocadas nas garras pneumáticas do texturômetro. Estas estavam espaçadas com 40 mm de distância e a velocidade de tração era de 200 mm/minuto. As propriedades investigadas foram a resistência à tração máxima (MPa), o alongamento na ruptura (%) e o módulo de Young (MPa). Foram coletadas 17 medidas para cada amostra.

A tensão de ruptura (TR) foi calculada utilizando-se a Equação 1 onde a força máxima de rompimento do filme é dividida pela área da seção transversal inicial da amostra. O alongamento na ruptura (AL) foi determinado pela Equação 2, na qual a distância final de separação da garra é dividida pela distância inicial de separação.

$$TR = F_m/A \quad \text{Equação (1)}$$

em que: TR é a tensão na ruptura [Pa]

F_m é a força máxima no momento da ruptura [N].

A é a área da seção transversal do filme [m²]

$$AL = ((d_r - d_i)/d_i)*100 \quad \text{Equação (2)}$$

em que: AL é o alongamento na ruptura [%].

d_r é a distância no momento da ruptura [cm].

d_i é a distância inicial de separação [cm].

4.1.3 Permeabilidade ao Vapor de Água

As amostras foram condicionadas em umidade relativa de $53\% \pm 2\%$ a uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, os testes foram conduzidos em triplicata. Cada película foi fixada em uma cápsula de determinação de permeabilidade com um diâmetro interno de 60 mm, contendo em seu interior cloreto de cálcio anidro ($\pm 2\%$ UR). Foram realizadas pesagens periódicas, até que a taxa de ganho de massa fosse constante. A taxa de permeabilidade ao vapor de água foi calculada utilizando a Equação 3 (Método da American Society for Testing and Material (ASTM E96 – 95), 1995), com modificações.

$$TPVA = (m/t).(1/A) \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: m/t é o coeficiente angular da reta de ganho de massa (g) versus tempo (t), e A é a área de permeação (m^2).

Assim o valor de permeabilidade ao vapor de água pode ser calculado de acordo com a Equação 4:

$$PVA = \left[\frac{TPVA}{ps \cdot (UR_{ext} - UR_{int})} \right] \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{Pa} \cdot \text{h}$),

TPVA (taxa de permeação ao vapor de água) ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$), e a espessura média do filme (média de 5 medidas) (m),

ps é a pressão de saturação de vapor à temperatura do ensaio (Pa),

UR_{ext} : a umidade relativa no exterior da cápsula (%) e,

UR_{int} : a umidade relativa no interior da cápsula (%).

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise de superfície das películas e a região de fratura foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura JEOL LSMP 100 (Japão) do Laboratório de Microscopia Central Analítica da UEM - COMCAP, com objetivo de avaliar e comparar a microestrutura dos filmes contendo alginato, eritrosina e

diferentes tipos de ácido. As amostras foram condicionadas em dessecador com cloreto de cálcio, para remoção da umidade, por 3 semanas, após este tempo as amostras foram cortadas com tesouras para visualização das bordas de corte. Posteriormente foram revestidas, respectivamente, com capas de carbono e ouro por um Sputter Coater BAL-TEC SCD 050. Após este preparo foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura para análise da superfície e da borda.

4.1.5 Análise microbiológica *in vitro*

Inicialmente testou-se a efetividade das coberturas de alginato, para inativação de uma bactéria Gram-negativa *Escherichia Coli* ATCC 25922. A bactéria foi mantida em Caldo triptona Soja (TSB) (Disco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), suplementado com 20% de glicerol a -20 °C. Antes da utilização, uma alíquota foi transferida para um Caldo de Infusão de Coração Cerebral (BHI) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e incubada durante 24 h a 35 °C. Posteriormente, o inóculo foi padronizado usando escala de mcfarland 0,5 para produzir uma suspensão bacteriana que continha aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias por ml (UFC/mL). Esta suspensão padronizada foi diluída em salina aproximadamente 10^7 CFU/mL para uso nos experimentos.

Uma alíquota (50 µL) de suspensão bacteriana a 10^7 UFC/mL foi homogeneizada com 950 µL de soluções filmogênicas, e mantidos no escuro durante 10 minutos. Após a incubação, 500 µL de cada amostra foram colocadas em poços inferiores e iluminadas com uma lâmpada de LED verde (comprimento de onda máximo de 510 nm; potência do LED de 0,4 W), para todas as bactérias o tempo de fototrradiação foi de 15 min. O efeito antibacteriano da fotossensibilização foi realizado em *E. Coli*. As diluições apropriadas das amostras tratadas e dos grupos de controle foram inoculadas em placas de Agar de soja triptico (TSA, Difco) e incubadas a 37 °C durante 24 h. As populações de células sobreviventes foram enumeradas e expressas como log UFC/mL. O experimento foi realizado em duplicata.

As películas produzidas para a análise *in vitro* foram:

- Controle
- Alginato + água

- Alginato + Ácido cítrico
- Alginato + Ácido láctico
- Alginato + Ácido málico
- Eritrosina + água
- Eritrosina + Ácido cítrico
- Eritrosina + Ácido láctico
- Eritrosina + Ácido málico
- Cloreto + água
- Cloreto + Ácido málico
- Cloreto + Ácido láctico
- Cloreto + Ácido cítrico
- Ácido Málico
- Ácido Cítrico
- Ácido Láctico

4.2 Aplicação da Cobertura em Queijo fresco e Avaliação de Vida de prateleira

As amostras de queijo fresco, recém processadas (24h após produção), foram adquiridas diretamente de um Laticínio na região de Maringá - Pr. O queijo foi cortado em 8 pedaços de aproximadamente de 30 g, na superfície destas amostras foram inoculadas a suspensão de células de *Escherichia Coli* ATCC 25922 por espalhamento, assim que a superfície absorveu a solução de células foram entornadas 15 mL de cada cobertura por toda a superfície da amostra, e em seguida 15 mL de cloreto de cálcio e o excesso eliminado. Após as amostras foram submetidas a TFD. Todas as amostras foram colocadas em isopor, e embaladas com PVC, e mantidas em estufa BOD a 5 °C, e analisadas nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

As amostras elaboradas foram as seguintes:

- Tratamento controle: Sem cobertura
- Tratamento 1: Alginato, Eritrosina, ácido cítrico e Luz,
- Tratamento 2: Alginato + Eritrosina e Luz,
- Tratamento 3: Alginato+ Ácido Cítrico+Luz,

- Tratamento 4: Alginato + Luz,
- Tratamento 5: Alginato.

4.2.1 Preparo do inóculo

A cepa bacteriana utilizada foi *Escherichia Coli* ATCC 25922 fornecida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. A cultura foi mantida em Caldo triptona Soja (TSB) (Disco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), suplementado com 20% de glicerol a -20 ° C. Antes da utilização, uma alíquota foi transferida para um Caldo de Infusão de Coração Cerebral (BHI) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e incubada durante 24 h a 35 ° C. A cultura foi transferida para Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e incubada nas mesmas condições.

4.2.2 Aplicação da Terapia Fotodinâmica

As amostras de queijo foram contaminadas com aproximadamente 15 mL de *Escherichia Coli* ATCC 25922, posteriormente aplicou-se a película com ácido cítrico, que teve o melhor resultado na análise *in vitro*, após isto, foram submetidas à radiação de luz com Led verde em 530 nm por 30 minutos, em uma caixa espelhada fechada “home made”, dois pedaços foram iluminados por vez. Todas as amostras foram mantidas em estufa BOD a 5 °C, e analisadas nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento (de acordo com o prazo de validade do fabricante), quanto ao crescimento *Escherichia Coli* ATCC 25922, perda de massa, acidez, pH e oxidação lipídica.

4.2.3 Análise microbiológica das amostras de queijo

As amostras de queijo foram submetidas à análise de sobrevivência de *Escherichia Coli* ATCC 25922, em Ágar seletivo EMB TEAGUE - Eosina Azul de

Metileno. As análises foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

As bactérias inoculadas foram analisadas diluindo 10 g da ricota em 90 ml de água peptona estéril (1 g / l). Diluições em série (10^{-1} a 10^{-7}) foram realizadas e plaqueadas em Ágar Eosina Azul de Metileno. As placas foram incubadas a 37° durante 24 h. os resultados são expressos em UFC/mL.

4.2.4 Análise da oxidação lipídica das amostras de queijo

A oxidação lipídica foi determinada por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) descrita por Pfalzgraf, Frigg, and Steinhart (1995), sendo que as análises foram realizadas em duplicata por um período 1,7,14, 21 e 28 dias.

4.2.5 Análise da perda de massa das amostras de queijo

A perda de massa foi acompanhada a partir do tempo 1, seguida do tempo 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento das amostras. A massa das amostras foi determinada por meio de pesagem, a cada 7 dias, em balança eletrônica com precisão de 0,001g. A perda de massa foi calculada por meio da Equação 5:

$$Pm = [(mi - mt)/(mi)] \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: mi era a massa inicial; mt massa a cada intervalo de tempo.

4.2.6 Análise de Acidez e pH

As análises de pH e Acidez (em ácido láctico), foram determinadas de acordo com o descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008), sendo realizada em duplicata nos dias 1,7,14, 21 e 28 dias.

4.3 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios da película foram realizados utilizando o Software Sisvar 5.7 (Build 91). Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) para determinar diferença entre as médias de cada grupo, seguido de Teste de média de Tukey, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propriedades Mecânicas

A análise das propriedades mecânicas das películas é de extrema importância, pois através dela é possível identificar e caracteriza-las quanto a resistência e comportamento do material ao ser aplicada uma tração até o rompimento (RIGO, 2006). As propriedades mecânicas foram avaliadas para os 4 tratamentos.

Os resultados das propriedades mecânicas em termos de resistência à tração, módulo de Young, alongamento na ruptura e espessura dos filmes estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 2 – Resultados da Tração na Ruptura, Alongamento e Módulo de Young das películas de alginato com eritrosina com e sem a adição de ácido.

AMOSTRAS	TRAÇÃO (MPa)	MODULO DE YOUNG (Mpa)	ALONGAMENTO (%)	ESPESSURA (μm)
PADRÃO	7,39 ^{a,b}	55,04 ^a	34,46 ^a	0,096 ^a
ÁCIDO CÍTRICO	10,57 ^b	78,55 ^b	19,56 ^b	0,13 ^b
ÁCIDO LÁTICO	15,32 ^c	51,34 ^a	28,13 ^{a,c}	0,099 ^a
ÁCIDO MÁLICO	6,61 ^a	33,19 ^c	23,19 ^{b,c}	0,11 ^{a,b}

^{a,b,c} Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ao nível de 5% (Teste de Tukey).

As análises para resistência a tração e modulo de Young apresentaram resultados com diferença significativa ($p \leq 0,05$) e confirmadas pelo teste de Tukey. Como pode ser observado na Tabela 2, os resultados de resistência á tração e módulo de Young variaram de 7,39 a 15,32 MPa e 33,19 á 78,55 MPa, respectivamente.

O módulo de Young é um indicador de rigidez do filme, quanto maior o modulo mais rígido é o material (OLIVEIRA, et al. 1996). Isso pode ser verificado no tratamento com ácido cítrico.

Já a alongação é a relação entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial, podendo ser determinada para a situação de ruptura, ou seja

mede a capacidade de esticar. A adição de ácido influenciou a alongação dos tratamentos com ácido cítrico e málico em relação ao controle (Padrão – sem adição de ácido).

Para a análise de espessura verifica-se que a adição de ácido láctico não indicou diferença significativa a 5% de significância, indicando adequado controle da solução depositada nas formas. As espessuras variaram de 0,096 a 0,13 μm , variações na espessura de um material implicam em problemas no seu desempenho mecânico e perda de barreira, que comprometem o desempenho da embalagem. A característica de cada filme pode ser influenciada pela morfologia e massa molar dos componentes utilizados

Galus e Lenart (2013) observaram uma tensão de ruptura mais alta (35 MPa) e uma alongação bem menor (8,6 %), esta diferença pode ter sido causada pela diferença no preparo ou pela porcentagem utilizada de alginato que foi de 1,5 % de, enquanto neste trabalho utilizamos a concentração de 2% de alginato.

Turbiani & Kieckbusch (2011), avaliaram os efeitos da reticulação de filmes de alginato (1,5%) com benzoato e cloreto de cálcio, os autores encontraram valores de 58,7 a 123,3 MPa e de 0,71 a 2,66%, respectivamente, para tração na ruptura e alongamento.

Estudos feitos por Davanço (2006) mostraram que a adição de ácido esteárico provocou diminuição na tensão da ruptura.

Embora a diferença nas concentrações de alginato e o tipo de alginato podem explicar as variações encontradas nos resultados, há também a hipótese de que estas variações foram causadas pela adição de ácido, já que o alginato é um polissacarídeo, onde as unidade são ligadas por ligações glicosídicas. Estas ligações podem sofrer hidrólise devido a presença do ácido, tanto que a diminuição observado na alongação pode ter sido ocasionado pela menor flexibilidade da estrutura polimérica, uma vez que algumas ligações foram hidrolisadas e a estrutura ganhou menor flexibilidade.

5.2 Permeabilidade ao Vapor de Água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é a medida da facilidade com que um material pode ser penetrado pelo vapor de água (KROCHTA, MULDER-

JOHNSTON, 1997). A adição de ácido não alterou a permeabilidade ao vapor de água das películas avaliadas (Tabela 3).

Os valores de permeabilidade ao vapor de água das películas de alginato e eritrosina estudados, foram superiores do que observado por Benavides (2012) que em sua formulação foram preparadas filmes com alginato incorporadas com óleo essencial de orégano ($3,1 \times 10^{-9}$ g./m.Pa.s). Esta diferença pode ser atribuída a presença de óleo, que ao contrário da eritrosina, é uma molécula de caráter hidrofóbico.

Tabela 3 – Permeabilidade ao vapor de água das películas de alginato com eritrosina com e sem a adição de ácido.

AMOSTRAS	Permeabilidade ao vapor de água (g/m.Pa.s)
Amostra Padrão	$1,99 \times 10^{-7} \text{ }^a \pm 1,93 \times 10^{-7}$
Ácido Cítrico	$7,83 \times 10^{-8} \text{ }^a \pm 3,71 \times 10^{-10}$
Ácido Lático	$7,19 \times 10^{-8} \text{ }^a \pm 2,25 \times 10^{-8}$
Ácido Málico	$9,17 \times 10^{-8} \text{ }^a \pm 1,85 \times 10^{-8}$

^a Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ao nível de 5%.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das películas produzidas, com ou sem incorporação de ácido, pode ser analisada por microscopia eletrônica de varredura. Foram realizadas micrografias das superfícies e também da bordas das membranas. As micrografias da superfície das coberturas Controle, Ácido Málico, Ácido Lático e Ácido Cítrico são apresentadas, na Figura 3.

A micrografia da superfície da película controle (sem adição de ácido) (Figura 3A), apresenta presença de manchas, decorrentes, possivelmente da maior concentração de eritrosina, o que pode causar uma descontinuidade na estrutura da película aumentando assim a permeabilidade ao vapor de água e a gases, ocasionando provavelmente a perda de massa.

A formação de cristais foi aparentemente acentuada pela presença de ácido málico e ácido cítrico (Figuras B e D, respectivamente), tendo em vista que estes não foram observados nos filmes de alginato de sódio puro (controle) e da película com ácido láctico. A micrografia de superfície do filme de alginato com ácido láctico mostrou maior homogeneidade, sem manchas e rachaduras. Esse comportamento parece razoável se considerarmos que a estrutura do ácido, que podem interagir e modificar a estrutura da película. Diferentemente, El-Sakhawy e Hassan (2007) observaram em seus estudos que o tipo de ácido e a celulose empregada na hidrólise dos filmes não produziram diferença na morfologia das partículas de cada material observado por microscopia eletrônica de varredura.

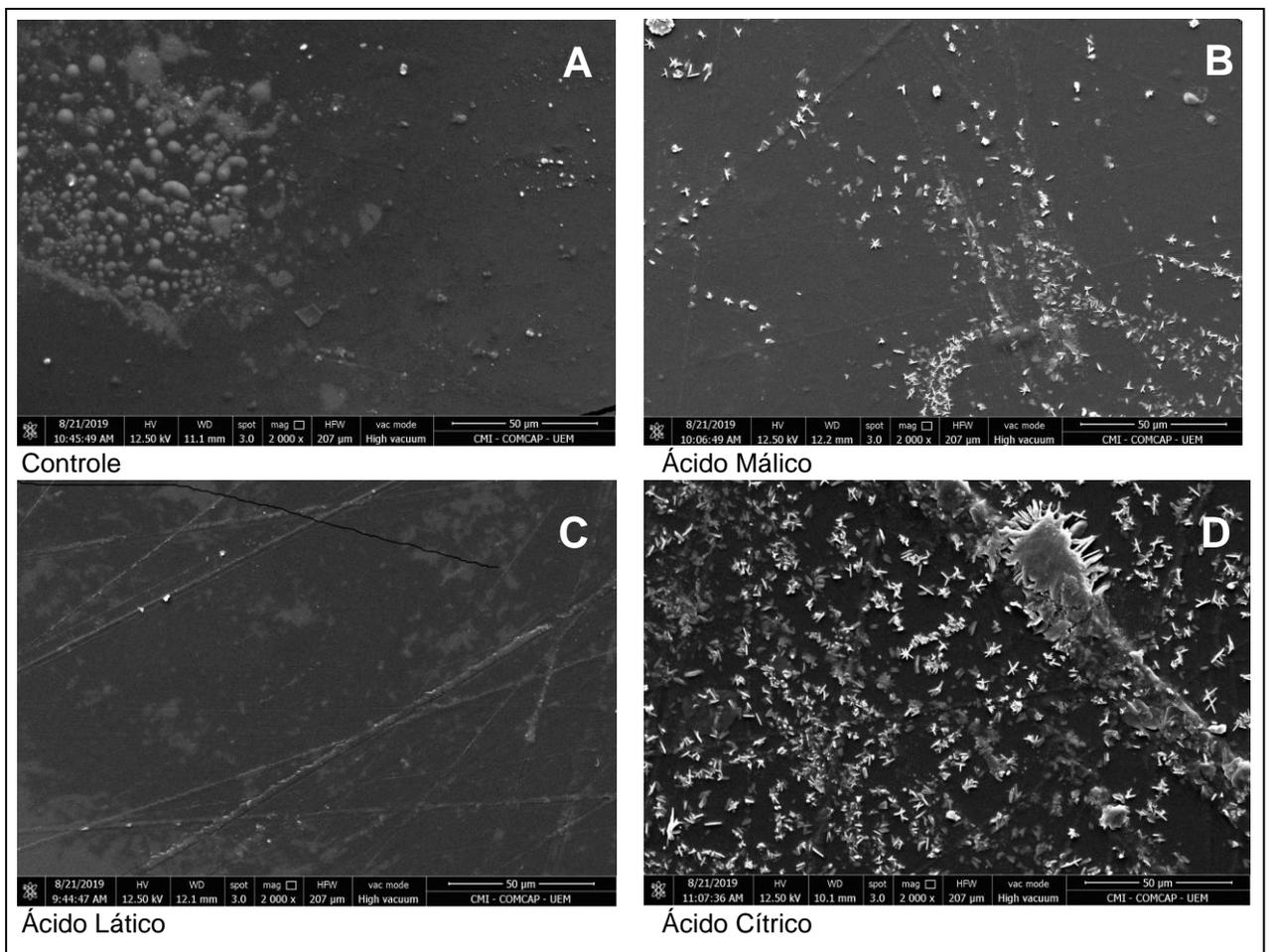


Figura 3 – Micrografias da superfície dos filmes alginato com eritrosina e ácido

As imagens das microestruturas das bordas onde foram realizados os cortes com tesoura (Figura 4), mostraram que aparentemente não existem

diferenças entre as morfologias das membranas na borda preparadas na presença e na ausência de diferentes ácidos.

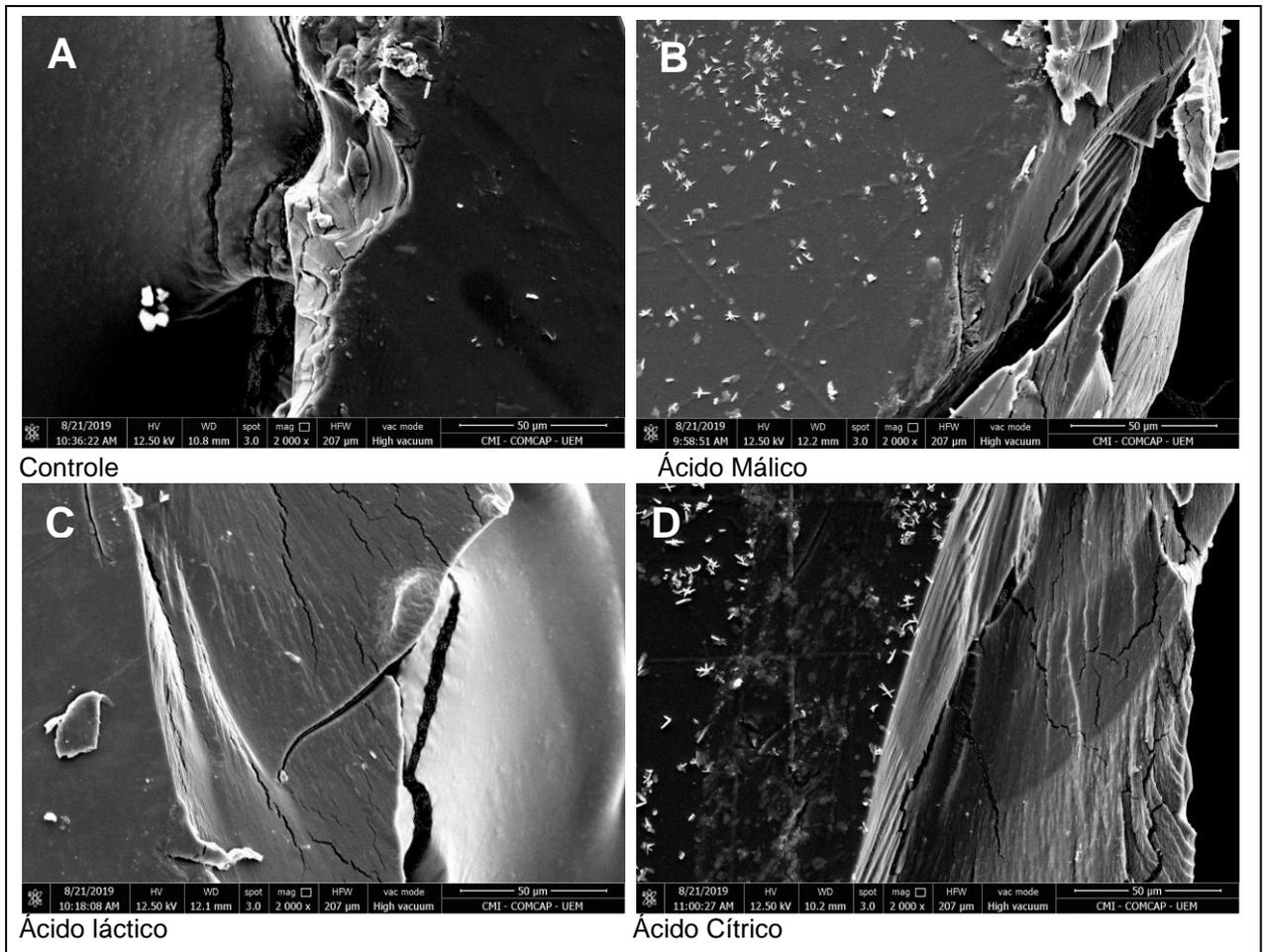


Figura 4 – Micrografias da borda de corte dos filmes alginato com eritrosina e ácido.

5.3 Análise microbiológica in vitro

A efetividade da aplicação da coberturas de alginato com diferentes tratamentos para inibição da *E. Coli* ATCC 25922, pode ser verificado na Tabela 4.

Quando a iluminação com luz UV foi utilizada, somente a presença dos ácidos nas películas não foram efetivos para inibir o crescimento da *E. Coli* (Tabela 4), mas o efeito combinado da eritrosina e dos ácidos inibiu 100% o crescimento deste patógeno.

Na ausência de luz e presença de eritrosina, o ácido cítrico foi o que apresentou maior efetividade no controle do crescimento do patógeno, tendo uma

redução de 56%, por esta formulação foi escolhida para a película usada nos experimentos de aplicação em queijos.

Tabela 4 – Valores médios para análise *in vitro* de diferentes películas na inibição do crescimento de *E. Coli* (log UFC /g)

	Com luz	Sem luz
Controle	6,53 ^b	7,44 ^c
Alginato + AGUA	6,9 ^b	7,44 ^c
ALGINATO + CÍTRICO	6,93 ^b	7,41 ^c
ALGINATO + LÁTICO	6,02 ^b	6,98 ^c
ALGINATO + MÁLICO	6,45 ^b	7,36 ^c
ERY + ÁGUA	2,57 ^b	7,02 ^c
ERY + CÍTRICO	0 ^a	3,29 ^a
ERY + LÁTICO	0 ^a	4,69 ^b
ERY+MÁLICO	0 ^a	6,65 ^c
CLORETO + ÁGUA	7,52 ^b	7,31 ^c
CLRETO + MÁLICO	7,52 ^b	7,26 ^c
CLORETO + LÁTICO	7,41 ^b	7,03 ^c
CLORETO + CITRICO	7,18 ^b	6,87 ^c
MÁLICO	6,67 ^b	6,98 ^c
CÍTRICO	7,15 ^b	6,63 ^c
LÁTICO	7,16 ^b	7,13 ^c

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indica que os tratamentos são significativamente diferentes (p <0,05; teste de Tukey).

5.4 Análise microbiológica das amostras de queijo

Os efeitos da película de alginato adicionada de ácido cítrico, eritrosina e TFD, sozinhos ou combinados contaminado por *E. Coli* ATCC19522, em 5 tempos diferentes ao longo da vida de prateleira (28 dias) são mostradas na Tabela 5.

Somente depois de 7 dias de armazenamento dos queijos, a cobertura com eritrosina e ácido cítrico mostrou-se mais efetiva que os outros tratamentos, resultado este que não foi observado ao longo dos outros dias.

A efetividade que as películas apresentaram na inibição do crescimento de células de *E. Coli in vitro*, não foi observada quando estas películas foram

aplicadas em queijos contaminados com este patógeno, esta diferença nos resultados podem ser atribuídos ao fato do queijo ser um alimento rico em nutrientes para crescimento destes patógenos, a dificuldade na aplicação das coberturas, fazendo com que a película ficasse muito fina diminuindo assim efetividade da fotodinâmica.

Tabela 5 – Valores médios para contagem do número de células de *E. Coli* (ATCC 25922) em ricotas adicionada de películas com alginato e diferentes combinações de ácidos e tratamento TFD

	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
Tratamento 1	4,36 ^{a,A}	5,1 ^{a,A}	7,85 ^{a,B}	7,29 ^{a,B}	7,81 ^{a,B}
Tratamento 2	4,25 ^{a,A}	7,79 ^{b,A,B}	7,86 ^{a,A,B}	7,32 ^{a,A}	8,03 ^{a,B}
Tratamento 3	4,54 ^{a,A}	7,68 ^{a,b,B}	7,89 ^{a,B}	7,99 ^{a,B}	7,90 ^{a,B}
Tratamento 4	4,29 ^{a,A}	7,63 ^{a,b,B}	7,39 ^{a,A,B}	7,21 ^{a,A,B}	8,14 ^{a,B}
Tratamento 5	4,34 ^{a,A}	7,71 ^{a,b,A,B}	7,89 ^{a,A,B}	7,91 ^{a,B}	7,95 ^{a,B}

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo dia de armazenamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ao longo do armazenamento para cada um dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Devido à alta umidade e à disponibilidade de nutrientes, como lactose e sais minerais, a ricota é considerada como um produto com ótima condição para a multiplicação de microrganismo (CERESER et al., 2011). Além disso, por ser bastante manipulado durante sua fabricação, há possibilidade de contaminação se não possuir práticas higiênico-sanitárias adequadas, por isso, é de extrema importância, buscar alternativas e ações para melhorar a qualidade e o padrão microbiológico das ricotas (CAVALCANTI, 2014). Já Santos (2009), destaca em sua pesquisa, que o pH ácido, também pode ser fator determinante na diminuição da contagem microbiológica.

5.5 Análise de Oxidação lipídica

Os tratamentos utilizados não alteraram a rancificação das amostras de queijo, este é um resultado muito interessante pois a presença da luz é um fator pró-oxidante na reação da oxidação lipídica (Tabela 6).

Ao longo do armazenamento a ricota, teve um leve aumento inicial dos níveis de malonaldeídos, seguidos por uma redução em seus valores. Comportamento semelhante encontrado na utilização da pimenta brasileira nos queijos com um aumento inicial de níveis de malonaldeído, que são compostos secundários de oxidação, seguidos por uma redução (DANNENBERG *et. al.*, 2016). Esse comportamento pode ser explicado pois, a oxidação pode ter degradado o malonaldeído, transformando-os em outros produtos da oxidação.

Tabela 6 – Valores médios para taxa de Oxidação Lipídica ao longo dos dias e diferentes tratamentos na composição do queijo

	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28
Tratamento C	0,1685 ^{a,A}	0,1852 ^{b,A}	0,4660 ^{a,A,B}	0,4751 ^{a,A,B}	0,5756 ^{a,B}
Tratamento 1	0,0791 ^{a,A}	0,3389 ^{a,b,A,B}	0,2879 ^{a, A,B}	0,5890 ^{a,B}	0,5651 ^{a,b,B}
Tratamento 2	0,1454 ^{a,A}	0,1579 ^{b,A}	0,3445 ^{a,A,B}	0,5751 ^{a,B}	0,4283 ^{a,A,B}
Tratamento 3	0,1305 ^{a,A}	0,4526 ^{a,A,B}	0,3295 ^{a A,B}	0,6126 ^{a,B}	0,3614 ^{b,A,B}
Tratamento 4	0,1074 ^{a,A}	0,3431 ^{a,b,A}	0,4194 ^{a A,B}	0,5917 ^{a,B}	0,4060 ^{a,b,A,B}
Tratamento 5	0,0809 ^{a,A}	0,2105 ^{b,A,B}	0,2946 ^{a,A,B}	0,6320 ^{a,B}	0,3302 ^{b,A}

Os valores estão em mg malonaldeído/kg amostra.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo dia de armazenamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ao longo do armazenamento para cada um dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados encontrados foram similares aos obtidos por Dannenberg *et. al.* (2016), que verificou a ação anti oxidante do óleo essencial da pimenta brasileira nos queijos, encontrando valores entre 0 e 0,5mg de malonaldeído, com uma redução expressiva tanto dos compostos primários (peróxidos) quanto secundários (TBARS) da oxidação. Santos *et. al.*(2012) utilizou extrato alcoólico de alecrim e de óregano que diminuiu a produção de malonaldeído, evidenciando que

os mesmos tem atividade antioxidante..

5.6 Análise de perda de massa

Na Tabela 7, apresenta-se os resultados para a perda de massa, ao longo do tempo de armazenamento da ricota. Os tratamentos tem diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados. É possível identificar que o tratamento 3, é o que tem maior perda de massa, e o tratamento 5 é o que possui menor perda.

Tabela 7 – Valores médios para perda de massa de amostras de ricota armazenada a 5°C ao longo de 28 dias.

	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28
Tratamento C	0 ^{a,A}	11,47 ^{e,A}	23,89 ^{d,A,B}	32,88 ^{d,B,C}	42,75 ^{d,C}
Tratamento 1	0 ^{a,A}	12,18 ^{d,A,B}	21,01 ^{e,B}	28,25 ^{e,B,C}	36,23 ^{e,C}
Tratamento 2	0 ^{a,A}	18,03 ^{c,A,B}	28,57 ^{c,A,B}	37,65 ^{c,B,C}	50,25 ^{b,C}
Tratamento 3	0 ^{a,A}	29,32 ^{a,A,B}	38,49 ^{a,A,B}	46,64 ^{a,B,C}	52,90 ^{a,C}
Tratamento 4	0 ^{a,A}	19,69 ^{b,A,B}	29,67 ^{b,A,B}	38,52 ^{b,B,C}	45,28 ^{c,B,C}
Tratamento 5	0 ^{a,A}	7,65 ^{f,A,B}	16,35 ^{f,A,B}	21,52 ^{f,B,C}	29,96 ^{f,B,C}

Os valores estão em % de perda de massa do queijo.

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo dia de armazenamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ao longo do armazenamento para cada um dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Verifica-se que o comportamento das amostras individualmente ao longo da vida de prateleira da ricota oscilam entre os tratamentos. Sendo que os valores médios para os tratamentos C, 1 e 5 durante o tempo de armazenamento apresentaram-se de acordo com os valores exigido pela Legislação (BRASIL, 1996), que classifica o queijo Ricota fresca como um produto de alta umidade, ou seja, de acordo com os padrões estabelecidos devem apresentar valores acima de 55 % umidade. Em estudos feitos por Myazaki (2018) verificou que ricotas com película de alginato e eritrosina perdeu 55% da massa ao longo do armazenamento.

5.7 Análise de acidez e pH

Na tabela 8, verifica-se os resultados para análise de acidez, onde entre os tratamentos quando comparados com o Tratamento C não houve diferença significativa ($p < 0,05$), nos 21 dias de armazenamento. Dessa forma, pode-se relacionar a perda de massa (Tabela 7) com o aumento na concentração de ácidos orgânicos, aumentando os valores de acidez.

Tabela 8 – Valores médios para análise de acidez de amostras de ricota armazenada a 5°C ao longo de 28 dias.

	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28
Tratamento C	0,10 ^{a, A}	0,38 ^{a, B}	0,70 ^{a, B}	0,88 ^{a, C}	2,50 ^{a, D}
Tratamento 1	0,11 ^{a, A}	0,49 ^{a, B}	0,48 ^{a, B}	0,82 ^{a, C}	1,17 ^{c, D}
Tratamento 2	0,10 ^{a, A}	0,38 ^{a, A, B}	0,48 ^{a, B}	0,91 ^{a, C}	1,57 ^{c, D}
Tratamento 3	0,11 ^{a, A}	0,27 ^{a, A}	0,64 ^{a, B}	0,86 ^{a, B}	1,35 ^{b, c, C}
Tratamento 4	0,10 ^{a, A}	0,38 ^{a, A, B}	0,54 ^{a, B}	1,10 ^{a, C}	1,12 ^{c, C}
Tratamento 5	0,10 ^{a, A}	0,39 ^{a, A, B}	0,41 ^{a, B}	0,96 ^{a, C}	1,26 ^{b, c, D}

Os valores estão em % ácido láctico (m/v).

^{a, b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo dia de armazenamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A, B} Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ao longo do armazenamento para cada um dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Estudo realizado por Esper *et al.* (2007), encontrou valores de acidez titulável em ricotas, entre 0,13% e 1,25%, demonstrando a grande variação de acidez entre as amostras analisadas. Já Henning e Piola (2013), encontraram valores de 0,47% de acidez para a ricota saborizada.

Os tratamentos tiveram praticamente o mesmo comportamento com relação ao aumento da acidez, diferenciando principalmente a acidez no Tratamento C, do dia 21 para o dia 28, que teve um aumento de aproximadamente 185%.

Na Tabela 9, é possível encontrar os valores para pH ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 9), verifica-se que não houve diferença significativa em seus valores no Tratamento C. Nos demais tratamentos (1, 2, 3, 4 e 5) verifica-se que se diferenciaram significativamente entre o tempo de armazenamento ($p < 0,05$). Quando se compara os tratamentos ao longo dos dias, verifica-se que no dia 1, que os tratamento C, 3, 4 e 5 não apresentaram diferença entre si, porém nos demais dias existe diferença significativa entre as amostras.

Tabela 9 – Valores médios para análise de pH de amostras de ricota armazenada a 5°C ao longo de 28 dias.

	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28
Tratamento C	6,70 ^{a,A}	6,83 ^{a,A}	6,41 ^{d,A}	6,72 ^{a,A}	6,74 ^{a,A}
Tratamento 1	6,30 ^{c,A}	6,65 ^{e,A,B}	6,70 ^{a,B}	6,64 ^{b,A}	6,71 ^{b,B}
Tratamento 2	6,60 ^{b,A,C}	6,76 ^{d,A}	6,5 ^{b,A}	6,47 ^{c,C}	6,42 ^{d,B}
Tratamento 3	6,70 ^{a,A,C}	6,8 ^{b,C}	6,15 ^{f,B}	6,28 ^{e,A,B}	6,34 ^{f,A,B,C}
Tratamento 4	6,70 ^{a,A,B}	6,78 ^{c,B}	6,22 ^{e,A,C}	6,04 ^{f,C}	6,56 ^{c,A,B,C}
Tratamento 5	6,70 ^{a,A}	6,66 ^{f,A,B}	6,48 ^{c,A,B}	6,30 ^{d,B}	6,40 ^{e,B}

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos para um mesmo dia de armazenamento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ao longo do armazenamento para cada um dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Utilizou-se o alginato para conservação de maçãs, e o pH, das mesmas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Sendo que o valor de pH é expresso pela quantidade de ácido que está dissociado (FONTES, 2005).

Na avaliação de pH, Freire (2019) encontrou valores similares em filmes produzidos com fécula de mandioca, extrato de mandioca e cera de abelha.

6 CONCLUSÃO

A adição de ácido cítrico às películas de alginato e eritrosina aumentou a alongação, a espessura, a resistência a tração na ruptura, a rigidez das películas e a permeabilidade ao vapor de água. Mesmo com estas alterações foi possível produzir películas resistentes na presença do ácido cítrico.

Após a análise *in vitro*, obteve-se a melhor opção para diminuição da bactéria *Escherichia Coli*, foi a película adicionada de ácido cítrico, que pode ser facilmente obtido. Com isso, realizou diversas análises, e pode se verificar que as películas possuem poder de diminuição na contagem microbiológica nos primeiros dias de armazenamento, menor perda de massa, acidez e ph controláveis. Também é possível concluir que a oxidação lipídica manteve-se dentro do esperado utilizando o ácido, possivelmente devido à degradação do malonaldeído.

A utilização de cobertura de alginato com eritrosina, ácido cítrico juntamente com a aplicação da terapia fotodinâmica, é uma opção viável para conservação de queijos frescos, por ser de fácil aplicação, barata e sustentável.

Contudo estudo mais aprofundados devem ser feitos para chegar no melhor denominador e controle de todas as análises realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 2001.

ALBUQUERQUE, M. V.; SANTOS, S. A.; CERQUEIRA, N. T. V.; SILVA, J. A. S. Educação Alimentar: Uma Proposta de Redução do Consumo de Aditivos Alimentares. *QUÍMICA NOVA NA ESCOLA*. Vol.34, 2012.

ANASTÁCIO, Lucas de Barros; OLIVEIRA, Danielle Aparecida; DELMASCHIO, Camila Rocha; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg; CHEQUER, Farah Maria Drumond. Corantes Alimentícios Amarantho, Eritrosina B e Tartrazina, e seus possíveis Efeitos Maléficos à Saúde Humana. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences – JAPHAC*, 2016

AZEREDO, Henriette M. C.; JARDINE, José Gilberto. Desidratação osmótica de abacaxi aplicada à tecnologia de métodos combinados. UNICAMP. 2000. Acessado em 20 de Julho de 2018. Disponível em: http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL20N1/VOL20N1_14.PDF

BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. Fundamentos de tecnologia de alimentos. São Paulo: Atheneu, 1998.

BENAVIDES, Sergio; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*. 110(2):232- 239, 2012.

BERTOLONI, G.; SALVATO, B.; DAL'ACQUA M.; VAZZOLER, M. E.; JORI, G.. Hematoporphyrin-sensibilized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *J. Photochem. Photobiol*, 39, 1984

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal DIPOA. Portaria 146, de 07 de Março de 1996. Publicado no DOU, de 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 de março de 1996, Seção 1, p. 3977-3986, 1996.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 78, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018

CAMPOS, M. R.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A .S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia Coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.4, 2006.

CAVALCANTI, F. B. Avaliação microbiológica do queijo "tipo ricota" comercializados em supermercados de Campina Grande - PB. 2014. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

CERESER, N. D., ROSSI JÚNIOR, O. D., MARCHI, P. G. F., SOUZA, V. de, CARDOZO, M. V., MARTINELI, T. M. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do estado de São Paulo. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 149-155, jan./mar. 2011.

CHEQUER, F. M. S, VENÂNCIO, V. P.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50:3447-3451.

CHIODA, T. P.; SCHOKEN-ITURRINO R. P.; GARCIA, G. R. PIGATTO; C. P. RIBEIRO, C. A. M.; RAGAZZANI, A. V. F. Inibição do crescimento de *Escherichia Coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.2, 2007.

COLES, Richard; MCDOWELL, Derek; KIRWAN, Mark J. *Food Packaging Technology*. 1ª ed. Londres: Blackwell Publishing, 2003.

CUQ, B.; GINTARD, N.; GUILBERT, S. (1995). Filmes e revestimentos comestíveis como camadas ativas. In: Rooney ML (eds) *Embalagem ativa de alimentos*. Springer, Boston, MA

DAMANTE, C. A. Desenvolvimento e testes *in vitro* de um novo corante para terapia fotodinâmica em Periodontia. Faculdade de Odontologia. Bauru, 2015.

DANNENBERG, G. S.; BELLINAZO, P. L.; CRUXEN, C. E. S.; AMES, C. W.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Óleo essencial de pimenta brasileira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) como antioxidante em queijo. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos e X CIGR Section VI International Technical Symposium, 2016, Gramado/RS. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos e X CIGR Section VI International Technical Symposium, 2016.

DANNENBERG, Guilherme da Silva; FUNCK, Graciele Daiana; MATTEI, Fábio José; da SILVA, Wladimir Padilha; FIORENTINI, Ângela Maria. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 36, p. 120-127, 2016.

DAVANÇO, Taciana. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido caproíco e surfactantes. 2006. 130p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em:

<<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255982>>. Acesso em: 5 ago. 2018.

DONHOWE, I.G., FENNEMA, O. (1994). Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and Testing Methods. In *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. J. M. Krochta (Ed). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc., pp 1-24.

EL-SAKHAWY, Mohamed; HASSAN, Mohammad L. Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues. *Carbohydrate polymers*, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2007.

ESPER, Luciana M.R; BONETS, Patrícia A; KUAYE, Arnaldo Y. Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, v. 66, n. 3, 2007.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de alimentos. 2 ed. São Paulo. Atheneu, 2000.

FEITOSA, T. BORGES, M. F. NASSU, R. T. AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do rio grande do norte. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2003.

FONTES, Luciana Cristina Brigatto. Uso de solução conservadora e películas comestíveis em maçãs de cultivar Royal Gala minimamente processadas: efeito na fisiologia e conservação. Piracicaba, 2005

FREIRE, Barbara Camila Firmino. Aplicação de coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de Romã na conservação de queijo tipo coalho. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal rural do Semi-árido. Mossoró, 2019

GALUS, S.; LENART, A. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 459–465, 2013.

GARCIA, Elaine Pereira; SILVA, Francesca Aparecida Ramos da; PAIVA Filho, Otávio Marques de; BRAGA, Ana Valéria Ulhano, MORELLI, Silvia Andreia; SANTOS, Rosana Francisco Siqueira dos. Qualidade microbiológica de queijos minas frescal e ricota comercializados na região metropolitana de Campinas-SP. *Rev Higiene Alimentar - Vol.31*, 2017.

GHATE, V. KUMAR, A. ZHOU, W. YUK, H. Effect of organic acids on the photodynamic inactivation of selected foodborne pathogens using 461 nm LEDs. *Food Control*, 2015.

GROPPO, V. D. et al. Efeito do cloreto de cálcio e da película de alginato de sódio na conservação de laranja 'Pera' minimamente processada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 107113. 2009.

HENING, Bruna; PIOLA, Raul de Lima. Desenvolvimento de ricota saborizada adicionada de oligofrutose. 2013. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos 4.ed - 1ª ed. digital /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008

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

KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Exp Dermatol*. 1999

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.6, 2001

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 2012

MIAKAZI, Juliana Beatriz. avaliação da eficiência de coberturas comestíveis de alginato e eritrosina com aplicação de fotodinâmica na conservação de queijos frescos. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá – Maringá – PR, 2018.

MÜRMAN, L.; MALLMANN, C. A.; DIKIN, P. Temperaturas de armazenamento de alimentos em estabelecimentos comerciais na cidade de Santa Maria, RS. *Acta Scientiae Veterinariae*, vol. 33, no. 3, 2005, pp. 309-313. Editorial Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, M. R. V.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; PADULA, M.; GARCIA, E. C.; COLTRO, L. Ensaio para Avaliação de Embalagens plásticas flexíveis. Centro de Tecnologia de Embalagem . CETEA. Campinas, 1996.

OLIVEIRA, P. G.; MACHADO, E. C. L.; BENTO, R. A. Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes*. – Vitória de Santo Antão, Pe, 2015.

OLIVEIRA, E. F.; TOSATI, J. V.; TIKEKARD, R. V.; MONTEIRO, A. R. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia Coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce Sanitation. *Postharvest Biology and Technology. USA*, 2018.

PAGANI, A. A. C. ; SANTANA, M. M. ; ALEXANDRE, A. P. S. ; SILVA, E. A. ; SILVA, G. F. . Aplicação de biopelículas pigmentadas em queijo de coalho. *REVISTA Geintec: Gestão, Inovação e Tecnologias* , v. 3, p. 041-047, 2013.

PEREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; DEL RIO, M.A. Color change of freshcut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology* 39, 84–92, 2016.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 2 Belo Horizonte – Minas Gerais. 2004. Acessado em 19 de Julho de 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v27n2/19276.pdf>

PFALZGRAF, A.; FRIGG, M.; STEINHART, H. . Alpha tocopherol contents and lipid oxidation in pork muscle and adipose tissue during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5), 1339-1342. 1995. doi: <http://dx.doi.org/0021-8561/95/1443>.

RIGO, L. N. Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Comestíveis. 2006. 130 f. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechin – RS, 2006.

SARIKAYA, R.; SELVI, M.; ERKOÇ, F. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 2012, 88:974–979.

SANTOS, Vidyany Aparecida Queiroz. Perfil microbiano, físico-químico e avaliação das boas práticas de fabricação (BPF) de queijos Minas frescal e ricota. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - São José do Rio Preto: [s.n.], 2009.

SANTOS, Renata Dinnies; SHETTY, Kalidas; CECCHINI, Alessandra Lourenço; MIGLIORANZA, Lucia Helena da Silva. Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante total de extratos de alecrim e orégano e sua aplicação em queijo à base de ricota. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(2), 655-666.2012.

SERNA, Carolina Pena. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a base de zeína, caracterização das propriedades funcionais e estruturais e avaliação do uso como

cobertura na conservação das características físico-químicas do queijo Minas padrão. São Jose do Rio Preto, 2015

SILVA, F. R.; SANTANA, C. M.; MELO, W. F.; TALABERA, G. G.; SARMENTO, W. E.; SOBRINHO, W. S.; SÁ, J. A.; MACHADO, A. V. M. Conservação e controle de qualidade de queijos: Revisão. 11 No. 04. Maringá, Paraná, 2017. Acessado em 20 de Julho de 2018. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/3752/conservaccedilatildeo-e-controle-de-qualidade-de-queijos-revisatildeo>

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão *Coliformes* a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção d*E. Coliformes* totais e *Escherichia Coli* EM ALIMENTOS. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2006.

SPELLMEIER, Júlia Grasiela; STÜLP, Simone. Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fotoquímico. Revista ACTA Ambiental Catarinense, 2009.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G. Mechanical and barrier properties of sodium alginate films obtained using calcium benzoate and/or calcium chloride as the crosslinking agent. Brazil Journal Food Technol., Campinas, v. 14, n. 2. 2011

YASSUNAKA, N. N.; FREITAS, C. F. , RABELLO, B. R.; SANTOS, P.R.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; NAKAMURA, T. U.; ABREU Filho, B. A.; MIKCHA, J. M. G. Photodynamic Inactivation Mediated by Erythrosine and its Derivatives on Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria. Current Microbiology, 2015.