

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

THIAGO SILVÉRIO SILVA

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE FILMES A BASE DE
POLICLORETO DE VINILA (PVC)
INCORPORADOS COM EUGENOL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
MAIO/2014**

THIAGO SILVÉRIO SILVA

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE FILMES A BASE DE
POLICLORETO DE VINILA (PVC)
INCORPORADOS COM EUGENOL**

ORIENTADORA: KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

DOURADOS/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586e	<p>Silva, Thiago Silvério. Elaboração e avaliação da atividade antimicrobiana de filmes a base de policloreto de vinila (pvc) incorporados com eugenol. / Thiago Silvério Silva, Kelly Cristina da Silva Brabes, Cibelli Mazzucato – Dourados, MS: UFGD, 2014. 57f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Embalagens. 2. Eugenol. 3. Antimicrobiano. 4. Vida de Prateleira. I. Brabes, Kelly Cristina da Silva. II. Mazzucato, Cibelli. III. Título.</p> <p>CDD – 616.01</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Elaboração e avaliação da atividade antimicrobiana de filmes à base de policloreto de vinila (PVC) incorporados com eugenol”**, de autoria de **Thiago Silvério Silva**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes
(Orientadora - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Roberta Torres Careli
Membro Examinador (UFMG)

Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
Membro Examinador (UFGD)

Profa. Dra. Farayde Matta Fakhouri
Membro Examinador (UFGD)

Profa. Dra. Sílvia Maria Martelli
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 28 de maio de 2014.

AGRADECIMENTOS

Com toda certeza a decisão de abandonar tudo e buscar em um sonho, um novo futuro, não foi nada fácil. Tenho certeza que não conseguiria chegar até aqui sem o apoio, orientação, colaboração e a paciência de muitas pessoas. Não quero ser injusto, mas é muito difícil conseguir expressar a gratidão que tenho por todos os envolvidos nessa importante etapa dentre muitas que virão.

Quero começar agradecendo a Deus, é meio clichê, eu sei, mas sem ele nos momentos difíceis nada seria possível. Agradei e agradeço todas as minhas conquistas e peço apenas força e sabedoria para continuar sempre em frente.

Esse agradecimento é para um conjunto de pessoas maravilhosas que formam minha base, meu alicerce, e que estão dispostos a me aconselhar e apoiar em minhas decisões. Minha mãe, Leila Regina Silvério Silva, representa todo amor, carinho e compreensão, sem dúvidas devo a ela todo meu lado pessoal e a grande vontade de lecionar. Meu pai, Paulo Roberto Batista da Silva, por me ensinar a ser justo e nunca desistir, buscando sempre fazer o meu melhor em tudo. A minha irmã Jéssica Silvério Silva por toda a torcida e pensamentos positivos.

Claro, minha eterna Orientadora, Kelly Cristina da Silva Brabes, por estar me (des) orientando desde 2007. Relação essa que ultrapassou o campo acadêmico e virou uma grande amizade, a qual pretendo cultivar por muitos e muitos anos. Não poderia ser melhor, além de termos visões acadêmicas parecidas, nossos gostos pessoais entram sempre em sintonia, contando com a presença de seu marido também, não é professor Rafael? Nunca vou me esquecer dos debates sobre Game of Thrones, Star Wars, Harry Potter, muitas e muitas séries e filmes. E claro, o melhor de todos, o mesmo gosto musical: Rock'n Roll!!!!!!!!!!!!

Obrigado a todos os professores que me aconselharam e também seguem envolvidos, direta ou indiretamente, nesse projeto: Fábio Negrão, Evaristo Falcão, Eriton Botero, Andreilson Rinaldi e Anderson Caires.

Valeu galera do LAB!!! Por todo o apoio e ajuda em muitas coisas chatas e fedidas (desculpa por todo o presunto autoclavado!!!). Obrigado Lujan (Japa brava que conheço desde 2007 também, que sempre me ajudou muito e tornou a utilização daquele espaço mais agradável), Débora (outra irmã do Rock!!!), Regiane (irmã sumida), Chaiane (não vou escrever nada, porque agora é mamãe!!), Ellen e Simone (a irmãs mais novas, que

ajudaram muito nas etapas finais), Nani (não sei escrever o nome dela ainda), Flor e Camila (irmãos velhos de longa data) e minha irmã mais complicada e com quem tive maior contato e afinidade, a toda fortuna: Cibelli (não vou citar as lágrimas aqui!! Muitas lágrimas!!!).

Para finalizar, agradeço ao programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – FACET, por proporcionar a realização do mestrado e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CPP	Contagem Padrão em Placa
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
g	Gramas
h	Hora
IV	Infravermelho
LIA	Lisina Ferro
mg	Miligrama
mL	Mililitros
nm	Nanômetros
NMP	Número Mais Provável
PCA	Plate Count Ágar
PVC	Policloreto de Vinila
PVCE	Policloreto de Vinila Incorporados com Eugenol
THF	Tetrahidrofurano
TSI	Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius
λ	Comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do Eugenol em *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella sp.* ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093. Solução estoque composta por eugenol (+/- 99 %), água destilada e Tween 80.21
- Tabela 2.** Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do Eugenol frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella sp.* ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093, com solução estoque composta por eugenol e álcool.22
- Tabela 3.** Tamanho médio dos halos de inibição (mm) dos filmes de PVC incorporados com eugenol frente às bactérias.25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.....27
- Figura 2.** Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar contaminados com *Escherichia coli* embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.....29
- Figura 3.** Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar contaminados com *Staphylococcus aureus* embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.....30
- Figura 4.** Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar contaminados com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.....30
- Figura 5.** FTIR das amostras de eugenol puro e filmes nas concentrações de 0% (PVC Puro), 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de eugenol na matriz polimérica de PVC.....31
- Figura 6.** FTIR do eugenol (99% de pureza) e do filme de PVC puro (0%) comparados aos filmes de PVC incorporados com eugenol a 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (m/m).....32
- Figura 7.** Espectro de fluorescência do eugenol nas concentrações variando entre 0 e 100%, diluídos em etanol.....33
- Figura 8.** Perfis de fluorescência dos filmes incorporados com eugenol, submetidos a excitação a 405nm.....34

Figura 9. Perfis de fluorescência das bactérias <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093 quando excitadas a 405 nm.....	35
Figura 10. Perfil de fluorescência do queijo Cheddar, excitado a 405 nm.....	35
Figura 11. Espectros de fluorescência do queijo Cheddar, com sua microbiota natural, ao longo do tempo, excitados a 405 nm, para os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40.....	36
Figura 12. Perfil de fluorescência do queijo tipo Cheddar (valores de sua área absoluta) ao longo do tempo, quando excitado a 405 nm, sob ação dos filmes incorporados com eugenol (PVCE0, PVCE20 e PVCE40) em diferentes tratamentos.....	37

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
ARTIGO	12
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. Materiais.....	15
2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Eugenol.....	16
2.3. Preparo dos filmes a base de Policloreto de Vinila (PVC).....	16
2.4. Ação antimicrobiana dos filmes incorporados com Eugenol.....	16
2.5. Análise microbiológica das amostras de queijo tipo Cheddar fatiado.....	17
2.6. Análise do desenvolvimento microbiano em queijo tipo Cheddar fatiado e embalado com PVC puro e incorporado com Eugenol.....	18
2.7. Perfis de FTIR e Fluorescência do material desenvolvido e do alimento utilizado...	19
2.8. Análise dos espectros de fluorescência dos filmes elaborados e do queijo tipo Cheddar em comparação à sua vida de prateleira.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
3.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Eugenol.....	23
3.2. Elaboração dos filmes de PVC.....	24
3.3. Incorporação do Eugenol ao Polímero de PVC.....	24
3.4. Ação antimicrobiana dos filmes incorporados com Eugenol.....	25
3.5. Caracterização microbiológica das amostras de queijo tipo Cheddar fatiado.....	27
3.6. Análise da vida de prateleira do queijo em contato com os filmes elaborados.....	28
3.7. Perfis de FTIR e Fluorescência dos reagentes e produtos utilizados.....	32
3.8. Análise dos espectros de Fluorescência dos filmes elaborados e do queijo tipo Cheddar em relação à sua vida de prateleira.....	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO I. Normas para Submissão: Revista Food Chemistry.....	43
ANEXO II. Tabelas Gerais de Resultados.....	52

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES A BASE DE POLICLORETO DE VINILA (PVC) INCORPORADOS COM EUGENOL

Thiago Silvério Silva ^a, Kelly Cristina da Silva Brabes, Cibelli Mazzucato.

^aUFGD/FACET – Mestrando em Ciência e Tecnologia Ambiental. carapots2@gmail.com

Resumo

Recentes pesquisas na área de embalagens destacam a incorporação de diversos aditivos às mesmas, com o intuito de promover alterações benéficas aos alimentos. Aliado ao conceito das embalagens ativas, filmes incorporados com compostos antimicrobianos tem ganho destaque, principalmente ao oferecer aditivos naturais, como os óleos essenciais e seus princípios ativos. O óleo de cravo (*Caryophyllus aromaticus*) é abordado como um dos compostos antimicrobianos naturais mais eficientes, com grande destaque para bactérias Gram Positivas e fungos. O eugenol, como principal constituinte do óleo essencial de cravo e principal agente antimicrobiano, é amplamente utilizado pela indústria e nas áreas de saúde, principalmente na odontologia. O presente trabalho avaliou sua ação em microrganismos patogênicos (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Klebsiella* sp. ATCC 706603, *Candida albicans* ATCC 90028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093) em sua forma pura e incorporado em filmes poliméricos a base de Policloreto de Vinila (PVC), ao associar sua eficácia como embalagem antimicrobiana em amostras de queijo tipo Cheddar fatiado. Análises essas realizadas em conjunto com técnicas de espectroscopia de fluorescência, como método alternativo à avaliação da vida de prateleira de alimentos. Os resultados observados comprovam a eficácia do eugenol em embalagens a base de PVC, as quais apresentaram ação nas bactérias estudadas, ao inibir seu desenvolvimento em meios cultivados. A espectroscopia de fluorescência e as técnicas de infravermelho por transformada de Fourier forneceram informações sobre as alterações ocorridas no alimento e nos filmes elaborados.

Palavras-chave: Embalagens, Eugenol, Antimicrobiano, Vida de Prateleira, PVC, Espectroscopia de Fluorescência.

ABSTRACT

Incorporating additives on packing intends to promote beneficial changes to food. Films incorporated with antimicrobial compounds have gained prominence, especially by offering natural additives such as essential oils and their active ingredients. Clove (*Caryophyllus aromaticus*) oil is considered one of the antimicrobial compounds that has the most efficiency, which the eugenol is the main constituent, widely used by industry and health. This study aimed to evaluate the action of eugenol on pathogenic microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Klebsiella* sp. ATCC 706603, *Candida albicans* ATCC 90028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 and *Staphylococcus aureus* ATCC 19093) in its pure form and incorporated into polymer films based on the Polyvinyl Chloride (PVC) by associating their antimicrobial effectiveness on sliced Cheddar Cheese samples. Analyses were performed with Fluorescence spectroscopy, such an alternative method to evaluate the shelf life of food. Results demonstrate that the eugenol inhibited the bacterial development in cultured medium, proving its efficiency when used in PVC-based package.

Keywords: Active package, Shelf life, Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

1. INTRODUÇÃO

O modo de vida da população é alterado ao longo das gerações. Atualmente, com o dinamismo global e a necessidade de produtos facilmente disponíveis e práticos para utilização ou consumo, tem-se uma demanda crescente no mercado de alimentos, a qual apresenta uma grande evolução na oferta de produtos processados. A indústria de embalagens, ao acompanhar esse desenvolvimento, procura suprir algumas necessidades desses produtos, desenvolvendo mecanismos de proteção cada vez mais eficientes.

Ao se analisar a produção e utilização de embalagens, observa-se, em destaque, as embalagens ativas, as quais promovem a interação do meio protetor com o produto, resultando em melhorias sensoriais ou em sua vida de prateleira. (SOARES et al., 2009)

Uma grande variedade de compostos naturais e sintéticos podem ser incorporados a diferentes materiais como plásticos, fibras têxteis e papel, a exemplo de íons metálicos, ácidos orgânicos, bacteriocinas, isotiocianatos e fungicidas, como os benzoatos, sorbatos e imazalil. O uso de embalagens com agentes antimicrobianos tem como vantagem a não incorporação do princípio ativo diretamente no alimento, ou seja, menores teores de conservantes entram em contato direto com o produto, atendendo uma tendência atual do consumidor, o qual busca alimentos minimamente processados e livre de conservantes. Os agentes antimicrobianos podem ser incorporados diretamente ao material de embalagem, em rótulos, etiquetas ou contidos em sachês (OLIVEIRA et al., 2004; SOARES et al., 2009).

Nesse foco, aliou-se às embalagens ativas os óleos essenciais e seus respectivos princípios ativos, os quais possuem histórico reconhecido de sua ação antimicrobiana, mas que atualmente ganharam grande destaque devido a tendência na redução de aditivos sintéticos aos alimentos. (SMITH-PALMER et al., 1998; DORMAN et al., 2000)

Destaca-se a eficiência do eugenol (2-alil-4-metoxifenol) em relação ao seu efeito antimicrobiano. Obtido principalmente do cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus*), o qual apresenta valores de 14% a 20% de óleo essencial e pode conter até 95% de eugenol, o qual pode ser encontrado também na canela, noz-moscada e manjeriço. (Ghosh et al., 2005).

A versatilidade do mercado, também promove fatores controversos no consumo, pois há uma grande evidência da preferência por alimentos com atributos “naturais”, em

contrapartida com o consumo de embalagens plásticas, as quais representam aproximadamente 30% do faturamento anual do setor. (IBRE/FGV, 2013)

Dentre os plásticos mais produzidos e consumidos no mundo, destaca-se o PVC (Policloreto de Vinila), o qual contém, em peso, 57% de cloro (derivado do cloreto de sódio - sal de cozinha) e 43% de eteno (derivado do petróleo), representando ainda um produto de grande versatilidade no mercado. Sua maior utilização é na construção civil e produtos duráveis (64%) e apenas 12% são destinados a produtos com baixa vida útil, entre 0 a 2 anos. Constituindo, assim, o plástico de menor expressão no lixo urbano. (MAQUIXIM, 2010)

Destacando a versatilidade e o uso do PVC em embalagens de alimentos, objetivou-se nesse trabalho a elaboração de um filme antimicrobiano à base de PVC incorporados com eugenol e sua ação frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Klebsiella sp.* ATCC 706603, *Candida albicans* ATCC 90028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella sp.* ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093. Avaliou-se ainda sua utilização como embalagem alternativa ao queijo tipo Cheddar fatiado e suas propriedades ópticas, pela espectroscopia de fluorescência e infravermelho por transformada de Fourier.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Materiais

Os reagentes (Tween 80 VETEC, etanol 92,8 INPM Quimidrol, Eugenol Iodontosul com pureza de 99 %, PVC em pó SIGMA e Tetrahidrofurano THF DINÂMICA), ágaros (caldo Mueller Hinton HIMEDIA, Água Peptonada Tamponada OXOID, Caldo Selenito Cistina ACUMEDIA, Rappaport-Vassilliadis ISOFAR, Ágar Salmonella-Shigella Ágar SS ACUMEDIA, Ágar Bismuto Sulfito ACUMEDIA, Ágar Lisina Ferro LIA HIMEDIA, Caldo Lauril Sulfato Triptose ACUMEDIA, Caldo EC ISOFAR, Ágar Baird-Parker HIMEDIA, Plate Count Agar HIMEDIA) e cepas microbianas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Klebsiella sp.* ATCC 706603, *Candida albicans* ATCC 90028) foram obtidos comercialmente.

As bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 19093 foram doadas pela Fundação André Tosello – Pesquisa e Tecnologia.

2.2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Eugenol

A Concentração Inibitória Mínima do eugenol foi determinada utilizando-se técnicas de microdiluição em placas (microplacas com fundo em “U”) de acordo com as normas da *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2011) para microrganismos, os quais foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093.

Cada poço foi preenchido com 100 μ L de caldo Mueller Hinton (HIMEDIA), 100 μ L do princípio ativo diluído e 10 μ L do inóculo (ZOGDA; PORTER, 2001).

Foram avaliadas duas formas de diluição do eugenol. Inicialmente, foi diluído em água destilada esterilizada com Tween 80 (VETEC) na concentração de 10 % (m/m), na concentração inicial de 100 mg/mL. Dessa solução, chamada estoque, retirou-se 100 μ L, os quais foram adicionados ao primeiro poço de cada linha da microplaca, representando uma concentração inicial de 952 μ g/mL. Realizaram-se, então, diluições seriadas até o 10^o poço, resultando em uma concentração final de 1,859 μ g/mL. Em seguida, 10 μ L de cada suspensão microbiana, devidamente ajustada na escala 0,5 de McFarland, foram distribuídas em todos os poços.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 h. A leitura foi realizada visualmente. Considerou-se como CIM o poço com a menor concentração onde não houve crescimento microbiano. Todas as três repetições foram realizadas em triplicata.

Para efeito confirmativo, os resultados visuais negativos foram submetidos a análise de comprovação de seus resultados, dos quais se retirou uma alçada de 10 μ L de cada poço e inoculou-se em placas de Petri contendo ágar Muller Hinton, incubadas a 35°C por 24 h.

Adotaram-se, como resultados válidos, as concentrações inibitórias nas quais não houve observação visual de crescimento nas microplacas e nas placas de Petri.

Devido às características do eugenol, tais como sua imiscibilidade com água mesmo com adição de Tween 80, julgou-se necessário realizar uma nova série de repetições, alterando o solvente de solução estoque. Houve a alteração da água e do Tween 80 por

etanol (96° GL – 92,8 INPM – Quimidrol), com a concentração inicial mantida (100 mg/mL). Foi realizada uma série de diluições com o etanol, para se estabelecer sua ação na concentração utilizada.

As análises da CIM foram realizadas em triplicata e em três repetições. Os valores obtidos provém da média das triplicatas e das repetições.

2.3 – Preparo dos filmes a base de Policloreto de Vinila (PVC)

O PVC diluído em Tetrahidrofurano (THF) foi submetido à agitação constante, em agitador magnético modelo 78 HW-I, por 4 horas e distribuído em placas de Petri (12 mL de solução por placa), com diâmetro de 8cm, os quais secaram em estufa com temperatura controlada de 40°C por 7 dias.

Os filmes fabricados compreenderam as concentrações de 1 %, 2 %, 3 %, 4 % e 5 % de PVC em THF (porcentagem relativa às massas dos reagentes), com o intuito de se avaliar a melhor concentração do polímero com características mais próximas ao PVC vendido comercialmente na forma de filmes plásticos para embalagens de alimentos, observado na concentração de 3 % de PVC.

Após a definição da concentração padrão do PVC em 3%, com massa de 0,36 g por placa de Petri, e definição da CIM do eugenol para os microrganismos estudados, definiu-se as concentrações do mesmo em 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 % (relacionadas à massa do PVC), com o filme sem adição de eugenol como controle.

Adotaram-se, então, as concentrações de 0 % (PVCE0), 5 % (PVCE5), 10 % (PVCE10), 20 % (PVCE20), 30 % (PVCE30), 40 % (PVCE40) e 50 % (PVCE50), de massa de eugenol em relação à massa de PVC, para utilização nas análises subsequentes, pois obtiveram os melhores resultados práticos. Os filmes nomeados como 0 % de eugenol foram utilizados como controle.

2.4 – Ação antimicrobiana dos filmes incorporados com eugenol

Utilizou-se uma técnica adaptada da CLSI (2003) para o teste de sensibilidade aos filmes de PVC puro e incorporado com eugenol por disco-difusão.

Os filmes, em todas as concentrações elaboradas, foram recortados em círculos com aproximadamente 1cm de diâmetro e avaliados, microbiologicamente, por meio do método de disco-difusão em ágar, frente aos microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 19093, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Klebsiella* sp. ATCC 706603, *Candida albicans* ATCC 90028.

Os discos dos filmes foram colocados sobre a placa de Petri, contendo Ágar Mueller Hinton (HIMEDIA) semeados com inóculo bacteriano, ajustado na escala 0,5 de McFarland. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 35°C e os resultados obtidos por meio da medição do diâmetro dos halos em milímetros.

Os testes foram realizados em triplicata nas três repetições.

2.5 – Análise microbiológica das amostras de queijo tipo Cheddar fatiado

O queijo tipo Cheddar fatiado foi adquirido no comércio local da cidade de Dourados/MS e transportado imediatamente e sob refrigeração ao laboratório de Microbiologia para as análises. As amostras foram avaliadas com base nas metodologias da APHA (2001), a qual é preconizada para análise de alimentos pela Resolução RDC n° 12, de 01 janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Utilizaram-se os padrões sanitários para alimentos representados na legislação para *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e Coliformes a 45 (BRASIL, 2001).

As análises para confirmação da presença ou ausência de *Salmonella* sp. foram analisadas pesando-se 25 g de cada amostra. Os pedaços de Cheddar pesados foram adicionados à 225 mL de Água Peptonada Tamponada (OXOID) e incubados a 35-37°C, por 24 horas.

Transferiu-se, então, 1,0 mL da amostra para o caldo Selenito Cistina (ACUMEDIA) e Rappaport-Vassiliadis (ISO FAR), incubando-os a 35°C por 24 h.

Utilizou-se o Ágar Salmonella-Shigella (Ágar SS - ACUMEDIA) e o Ágar Bismuto Sulfito (ACUMEDIA) como teste comprobatório, incubados 24 horas a 35-37°C. As colônias típicas obtidas nas placas foram inoculadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI – HIMEDIA) e Ágar Lisina Ferro (LIA – HIMEDIA) e incubadas por 24 horas a 35-37°C, para confirmação preliminar.

Para a avaliação de Coliformes a 45 e *E. coli* foi empregada a técnica do Número Mais Provável (NMP). Para o teste presuntivo, utilizou-se 1,0 mL das amostras, em tubos contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST - ACUMEDIA), os quais foram incubados em estufa a 35°C por 48 h. Foram selecionados os tubos considerados positivos, ou seja, com turvação do meio evidente e produção de gás no tubo de Durham.

Para o teste confirmativo, alíquotas de tubos positivos do caldo LST foram inoculadas em caldo *Escherichia coli* (caldo EC - ISOFAR) e incubados em banho-maria por 48 horas a 45°C. Os tubos com crescimento e produção de gás no tubo de Durham, são considerados positivos para coliformes termo tolerantes. Os tubos positivos do caldo EC foram selecionados para determinar o Número Mais Provável (NMP/g) a partir do número de porções positivas, utilizando-se a tabela do NMP, conforme preconiza a APHA (2001).

Para a análise de *Staphylococcus* sp. pesou-se 25 g do queijo, os quais foram diluídos em água peptonada tamponada (225 mL). Procederam-se diluições seriadas até 10^{-3} . Alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Baird-Parker (HIMEDIA) com emulsão de gemas e Telurito de Potássio (HIMEDIA). As placas foram incubadas a 35-37°C por 48 horas. Colônias típicas foram selecionadas para o teste de coagulase (APHA, 2001).

2.6 – Análise de desenvolvimento microbiano em queijo tipo Cheddar fatiado e embalado com PVC puro e PVC incorporado com eugenol

O queijo foi cortado e pesado em pedaços de aproximadamente 1 g, em pedaços quadrados, de forma asséptica, embalados nos filmes elaborados de PVC puro (PVCE0) e PVC incorporado com 20 % (PVCE20) e 40 % (PVCE40) de eugenol, concentrações adotadas de acordo com as características.

Os pedaços de queijo entraram em contato direto com o filme elaborado em dois lados, posteriormente, foram envoltos em filme PVC comercial, o qual não teve contato direto com o produto.

As amostras foram mantidas sob refrigeração a temperatura média de 4°C em refrigerador comum, sendo retiradas para análise de Contagem Padrão em Placa (CPP) nos tempos: 0 horas (imediatamente após ser embalado), 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h.

Cada pedaço de queijo retirado da embalagem foi colocado em tubos contendo 9,0 mL de citrato de sódio (diluição 10^{-1}), sendo diluído logo após, em água Peptonada (HIMEDIA) a 0,1 % até a diluição 10^{-3} nos tempos iniciais, e até 10^{-6} nos tempos finais.

Foram inoculadas 1,0 mL de todas as diluições em Ágar PCA (Plate Count Agar - HIMEDIA) pelo método de Pour Plate. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h e a leitura ocorreu através da contagem de colônias, obtendo-se assim, o perfil de desenvolvimento microbiológico, para a microbiota natural do queijo.

De acordo com a resolução vigente para controle microbiológico em alimentos (RDC nº 12), é aceitável uma contaminação por Coliformes a 45 °C e *Staphylococcus* coagulase positiva, em até 1000 UFC/g. Logo, foram propostos três sistemas envolvendo a contaminação intencional pelos microrganismos citados (BRASIL, 2001).

Foi realizada a ativação microbiana em caldo BHI por 24 h, com auxílio de um Swab esterilizado. Inocularam-se os microrganismos em pedaços de aproximadamente 1 g de queijo tipo Cheddar, constituindo assim quatro modelos para análise:

- Queijo Cheddar com sua microbiota natural,
- Queijo Cheddar inoculado com *E. coli*,
- Queijo Cheddar inoculado com *S. aureus*,
- Queijo Cheddar inoculado com *E. coli* e *S. aureus*.

A inoculação intencional servirá como base para avaliar a capacidade de redução da carga microbiana dos filmes elaborados com eugenol.

As análises foram realizadas em triplicata em todos os procedimentos, com um total de duas repetições.

2.7 – Perfis de FTIR e Fluorescência do material desenvolvido e do alimento utilizado

Nos ensaios de FTIR foram avaliados os filmes de PVC incorporados com eugenol e o eugenol. Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento da marca Jasco, modelo FTIR 4100 na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 1cm^{-1} . Para as medidas do eugenol, foi utilizado o mesmo equipamento com o acessório ATR Pro 450-S (Refletância Total Atenuada). A aquisição dos dados foi feita através do software Spectra Manager, de acordo com o fabricante.

As medidas de fluorescência foram aplicadas ao eugenol e aos filmes de PVC, para efeito comparativo de sua resposta. No eugenol foram realizadas diluições, considerando as concentrações de 0 a 60%, bem como o eugenol comercial. Para realização deste ensaio foi utilizado um espectrofluorímetro portátil da marca MM'Optics provido de uma fibra ótica em Y, um laser de diodo em 405 nm, um monocromador da marca Ocean Optics e um laptop com programa específico para aquisição dos dados experimentais, e também o espectrofluorímetro de bancada da marca Varian.

As análises realizadas no princípio ativo e nos filmes foram realizadas para diferenciar a concentração de eugenol disponível nos filmes incorporados e, se possível, mensurar as diferentes concentrações entre os tratamentos.

Para ser ter um padrão na excitação e aquisição dos dados experimentais, foi realizado medidas de fluorescência com a amostra posicionada a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da fibra ótica. A medida de referência ou controle foi realizada incidindo-se o laser diretamente sobre a superfície de apoio (corpo negro).

2.8 – Análise dos espectros de fluorescência dos filmes elaborados e do queijo tipo Cheddar em comparação à sua vida de prateleira

As medidas dos espectros de fluorescência foram realizadas nas amostras de queijo e nos filmes utilizados como embalagem, de acordo com os procedimentos já descritos no ensaio microbiano da vida de prateleira (item 2.6). Neste ensaio utilizou-se, novamente, o espectro fluorímetro portátil da marca MM'Optics.

Para realização das medidas de fluorescência, a amostra foi posicionada a uma distância de aproximadamente 1 cm da fibra ótica. Tal procedimento foi realizado para ser ter um padrão na excitação e aquisição dos dados experimentais. A medida de referência ou branco foi realizada incidindo-se o laser diretamente sobre a superfície de apoio (corpo negro).

Os dados experimentais, relacionados à contagem logarítmica dos microrganismos, adotados foram os valores da área abaixo da curva, obtida de uma série de 10 medidas em cada filme ou queijo, das curvas. As análises das duas repetições foram realizadas em triplicata.

As aferições dos espectros fluorescência foram realizadas nos modelos de análise de vida de prateleira do queijo com sua microbiota natural e com inoculação de microrganismos já descritos.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Eugenol

A Tabela 1 retrata a CIM para o eugenol ao se utilizar a diluição em água e Tween 80.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do Eugenol em *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093. Solução estoque composta por eugenol (+/- 99 %), água destilada e Tween 80.

<i>Microrganismo</i>	<i>CIM ($\mu\text{g/mL}$)</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	52,89 \pm 29,91
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076	34,71 \pm 19,68
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093	29,44 \pm 14,45

Os resultados encontrados demonstram que o controle negativo, meio de cultura e o eugenol diluído, apresentaram turvação, indicando uma resposta positiva, mas não característica do método, formação de uma massa circular, “botão celular” (massa celular circular representativa do desenvolvimento de microrganismos). Ao elaborar a solução estoque, foi observado que, mesmo após agitação em vórtex, havia uma nítida separação entre o eugenol e a água, mesmo com o aumento na concentração do Tween 80.

Em todos os poços da microplaca houve turvação e formação de uma massa circular, o qual se assemelhava com os resultados positivos das análises, logo se possui forte indício da ocorrência de resultados não condizentes com o indicado pela técnica.

Foi realizado CIM com o álcool etanol 96°GL (peso absoluto - PA) como solvente para o eugenol. A composição da solução estoque apresentou maior uniformidade, com menor turvação. A contraprova comparativa (branco) passou a apresentar pequena

turvação na microplaca, descaracterizando o “botão celular”. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do Eugenol frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093, com solução estoque composta por eugenol e álcool.

<i>Microrganismo</i>	<i>CIM ($\mu\text{g/mL}$)</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	29,75 \pm 6,07
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076	24,79 \pm 7,68
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093	16,53 \pm 4,96

Nas repetições utilizando o álcool como solvente, houve uma redução na CIM do eugenol, apresentando forma mais nítida a massa celular nos poços. Para efeito comparativo, depositou-se etanol em uma série de diluições seriadas nas microplacas, com variação na concentração de 79 $\mu\text{g/mL}$ a 0,3 $\mu\text{g/mL}$, retratando crescimento celular mesmo em sua maior concentração, ou seja, o etanol nessas condições não foi capaz de desenvolver efeito antimicrobiano.

Ambos ensaios demonstraram maior resistência de *Escherichia coli* (29,75 \pm 6,07 $\mu\text{g/mL}$) ao eugenol. Houve uma maior ação antimicrobiana do eugenol frente ao *Staphylococcus aureus* (16,53 \pm 4,96 $\mu\text{g/mL}$). A *Salmonella* sp. apresentou valores intermediários aos microrganismos avaliados (24,79 \pm 7,68 $\mu\text{g/mL}$).

Tippayatum et al (2007) relataram a CIM do eugenol por meio de discos-difusão, encontrando os valores de 8mg/mL de eugenol frente a *E. coli* e *S. aureus*. A CIM por esse método, é dependente da migração do princípio ativo para o meio, isso poderia elucidar a diferença entre os valores obtidos, pois no método de microdiluição em placas, o princípio ativo, o meio e os microrganismos compõem um sistema em fase líquida, o que pode facilitar a interação e a ação do eugenol.

Rashid et al (2012) avaliaram a ação do óleo essencial de *Artemisia indica* selvagem frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 96) e *Salmonella typhi* (ATCC-531), que apresentaram valores de 16 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

A ação do eugenol ainda foi comprovada por Wang et al (2010) em fungos *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Os valores foram de 38,6 e 39,9 $\mu\text{g/mL}$

respectivamente. O mesmo estudo avaliou outras espécies fúngicas, como *Phytophthora capsici* e *Fusarium graminearum*, com CIM acima de 100 µg/mL para ambas amostras.

Observa-se que ao se tratar de soluções oleosas, não há parâmetros de análise para avaliação da concentração inibitória mínima, ou seja, haverá diversidade nos valores obtidos dependendo diretamente do sistema proposto, da interação do princípio ativo com o meio e com os microrganismos.

3.2 – Elaboração do polímero de PVC

Foram realizadas apenas considerações subjetivas na comparação dos filmes de PVC elaborados com o comercial.

Os filmes obtidos nas concentrações de 1 % e 2 % ficaram fortemente aderidos à placa de Petri e mostraram-se muito finos.

Observou-se que com o aumento na concentração de PVC, o polímero apresentava menor flexibilidade, tornando-se quebradiço. Os filmes com 4 % e 5 %, demonstraram maior rigidez quando comparados aos filmes comerciais, inviabilizando sua utilização prática como proposto.

O filme que mais se assemelhou às características requeridas (semelhante ao filme de PVC adquirido comercialmente) foi o filme com 3 % de PVC, quando relacionadas as massas do PVC em pó e ao THF líquido, portanto, adotado como padrão das amostras.

3.3 – Incorporação do eugenol ao polímero de PVC

Os padrões adotados para definição dos modelos nos filmes incorporados ocorreu apenas subjetivamente, nos quais se observou a textura, odor, coloração e opacidade. Os filmes foram avaliados no sétimo dia após seu preparo, nas concentrações de 0 a 50 % de massa de eugenol em relação à massa de PVC.

Nos filmes de PVC incorporados com eugenol nas concentrações variando entre 0 a 5 %, houve formação de um filme transparente, mais rígido quando comparado às demais concentrações. A adesividade e a maleabilidade do material foram as menores entre as formas elaboradas.

Os filmes de PVC com eugenol variando entre 10 % a 30 % apresentaram características intermediárias de textura, opacidade e maleabilidade, quando comparadas

às outras concentrações. Ressalta-se a presença de forte odor característico do eugenol e coloração tendendo ao amarelo.

Os polímeros com 40 % e 50 % de eugenol demonstraram alta elasticidade e adesividade, quando comparado aos demais filmes produzidos, apresentando-se visivelmente amarelados.

3.4 - Ação antimicrobiana dos filmes incorporados com eugenol

A CIM representou o padrão inicial para elaboração das embalagens poliméricas com eugenol. Utilizou-se, então, os valores de 1 %, 2 %, 3 %, 4 % e 5 % de eugenol relacionados à massa de PVC em cada filme.

Ao avaliar sua ação nos microrganismos estudados, observou-se sua ineficácia, pois houve crescimento de massa celular em toda a região inoculada da placa de Petri contendo meio de cultura nutritivo. Ressaltando o crescimento de massa celular na região de contato dos filmes com o meio de cultura, o qual caracterizou a não migração do princípio ativo ao meio.

Realizou-se ensaios com os filmes incorporados em maiores concentrações, 5 % (PVCE5), 10 % (PVCE10), 20 % (PVCE20), 30 % (PVCE30), 40 % (PVCE40) e 50 % (PVCE50), adotando a nomenclatura de PVCE0 para o filme desprovido de eugenol.

Os filmes analisados não foram capazes de formar halos de inibição em *C. albicans* ATCC 90028, porém não houve crescimento de massa celular abaixo dos filmes PVCE30, PVCE40 e PVCE50.

Para *S. aureus* ATCC 19093, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 51299 e *Klebsiella* sp. ATCC 706603 nos filmes PVCE0, PVCE5 e PVCE10, observou-se grande desenvolvimento de massa celular em toda a placa, inclusive na superfície de contato do filme com o meio. Apenas o contato com a superfície contaminada não foi suficiente para inibir o crescimento microbiano.

Nos filmes PVCE20 e PVCE30 não houve formação de halos de inibição evidentes, no entanto, não houve crescimento de massa celular na região de contato dos filmes com o meio, caracterizando uma ação inibitória apenas por contato direto com a superfície, possivelmente devido a pequena migração de princípio ativo incorporado.

Já os filmes PVCE40 e PVCE50 foram capazes de formar halos de inibição evidentes e maiores que 1 cm de diâmetro médio, caracterizando a migração do princípio ativo e reforçando sua ação antimicrobiana.

Nas placas inoculadas com cepas de *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, houve crescimento de massa celular em toda a placa apenas nos filmes sem eugenol (PVCE0). Os filmes PVCE5, PVCE10 e PVCE20 não apresentaram halos de inibição evidentes, porém não houve crescimento de massa celular abaixo dos filmes, na superfície de contato.

Os filmes PVCE30, PVCE40 e PVCE50 foram capazes de formar halos de inibição maiores que 1 cm. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Tamanho médio dos halos de inibição (mm) dos filmes de PVC incorporados com eugenol em bactérias.

Microorganismo	Tamanho médio dos Halos de Inibição (mm)		
	PVCE30	PVCE40	PVCE50
<i>Salmonella</i> sp. ATCC 13076	11 ± 1,8	15 ± 1,1	23 ± 2,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0,3	13 ± 0,5	15 ± 2,1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19093	-	13 ± 1,2	19 ± 1,1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	12 ± 0,9	17 ± 1,7
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	-	7 ± 5,3	10 ± 0,5
<i>Klebsiella</i> sp. ATCC 706603	-	10 ± 0,7	14 ± 2,3

Os valores observados em estudos com óleo essencial de cravo variam de 15 a 30 mm para os microrganismos utilizados nesse ensaio. TRAJANO et al (2009), citando metodologia desenvolvida por GREGER et al (2000), observaram halos de inibição de 15 a 20 mm para *S. aureus* e de 15 a 30 mm para *E. coli*.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo, composto majoritariamente por eugenol (valores acima de 70 %), também foi estudado por LÓPEZ et al (2005), os quais concluíram sua eficiência sobre microrganismos, relatando sua maior ação em fungos filamentosos, seguidos pelas bactérias Gram Positivas.

TIPPAYATUM et al (2007) demonstraram a eficiência do eugenol em microrganismos Gram positivos e negativos, observando maior eficiência do princípio frente a *E. coli*, encontrando valores de $7,8 \pm 1,3$ mm para halos de inibição do composto na concentração de 8 mg/mL.

Os estudos observam comportamentos diferenciados das substâncias oleosas frente aos microrganismos. Os Gram negativos (*E. coli* e *Salmonella* sp.) foram observados como mais resistentes, devido a camada protetora de lipopolissacarídeos, a qual constituiria uma barreira frente a interação dos princípios ativos oleosos com o microrganismo, descrito por LÓPEZ et al (2005), resultados em acordo com trabalhos de JORDÁN et al (2013), no qual as cepas de *E. coli* obtiveram os menores resultados ao princípio ativo.

Os valores relatados em outros estudos, como por exemplo FREIDMAN et al (2002) e OLASUPOL et al (2003), podem confrontar essa teoria, observando valores aleatórios da interação dos princípios frente aos microrganismos.

Os resultados obtidos nesse ensaio, não apresentaram tendências conclusivas quanto a interação do princípio ativo oleoso frente aos microrganismos Gram positivos e Gram negativos, pois considerando-se o desvio padrão das análises, as cepas de *E. coli* e *S. aureus* apresentaram-se iguais.

Cada ensaio poderá obter resultados diferenciados. As variáveis observadas abrangem as diferentes cepas utilizadas, o princípio ativo e os mecanismos de interação das cepas com o princípio ativo e os meios de cultura, decorrentes das características propostas.

3.5 - Caracterização microbiológica das amostras de queijo tipo Cheddar fatiado

Os resultados obtidos nestas análises foram comparados aos Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos, queijos e produtos lácteos, da RDC nº 12 (BRASIL, 2001).

A legislação adota os valores de 10^3 UFC/g de Coliformes a 45 e *Staphylococcus aureus*, os resultados observados nas duas repetições apresentaram valores de 1.10^{-1} UFC/g, caracterizando um produto apto para consumo.

As análises para comprovação da presença de *Salmonella* sp., ausência em 25g de acordo com RDC nº 12, demonstraram sua ausência em todas as amostras avaliadas.

A manipulação e fracionamento do queijo tipo Cheddar inicialmente não foram suficientes para promover uma contaminação que ultrapassasse os limites estabelecidos pela RDC nº 12.

3.6 – Análise da vida de prateleira do queijo em contato com os filmes elaborados

O método utilizado para a análise das curvas de desenvolvimento microbiano foi a contagem padrão em placa, nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 96 h e 144 h.

O modelo de análise padrão, o qual utiliza apenas o alimento comercializado e sua microbiota natural, foi comparado a sistemas adicionados de microrganismos, compondo assim quatro análises da vida de prateleira: queijo tipo Cheddar puro (CP), queijo tipo Cheddar contaminado com *E. coli* (CEC), queijo tipo Cheddar contaminado com *S. aureus* (CS) e queijo tipo Cheddar contaminado com *E. coli* e *S. aureus* (CES).

Os modelos contaminados propostos tiveram o intuito de demonstrar a ação dos filmes incorporados com eugenol frente a alimentos com alta contaminação inicial, de acordo com as Figuras seguintes.

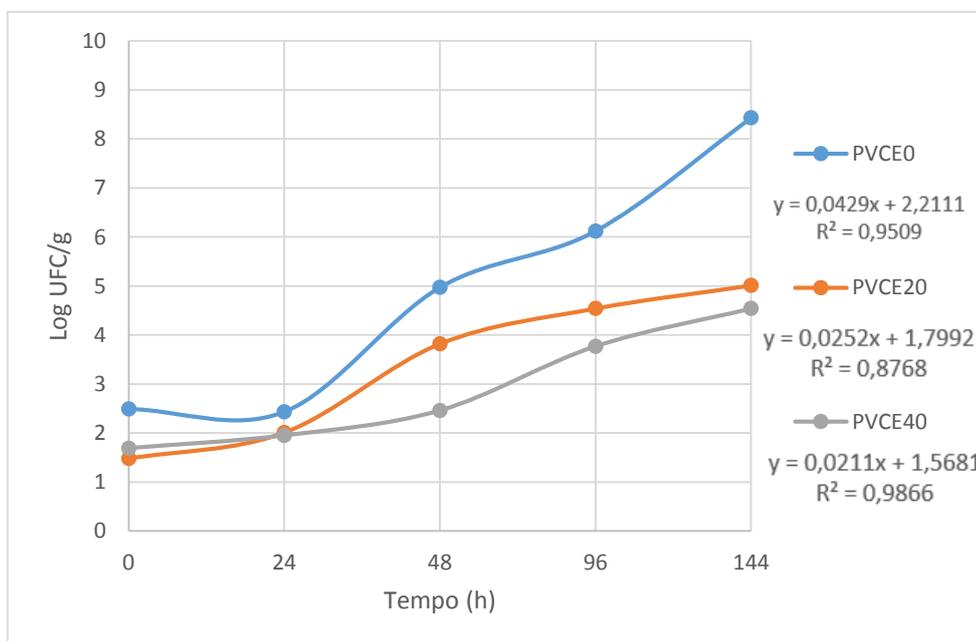


Figura 1. Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.

Em relação ao filme puro (PVCE0), observa-se que ao longo do tempo, houve um aumento na quantidade de microrganismos. Pode-se considerar que o filme não apresentou barreira química ou física ao desenvolvimentos dos microrganismos, nem mesmo foi capaz de retardar a fase de multiplicação celular. Apresentando ao final da análise os maiores valores.

O fator mais importante nessa análise é caracterizado pela contagem dos microrganismos no tempo de 48 h, a qual apresentou contagem de $9,3 \cdot 10^4$ UFC/g (Log de 4,97 UFC/g), pois ultrapassa o valor de 10^3 UFC/g estabelecidos pela legislação vigente (RDC nº 12). Tal resultado confronta a validade presente no rótulo do produto, 30 dias. A manipulação e o armazenamento pelo consumidor podem acelerar o processo de multiplicação microbiana e conseqüentemente a deterioração do alimento.

Os filmes PVCE20 e PVCE40 apresentaram valores menores para a contaminação do produto.

Ao se avaliar o modelo matemático descrito pelas curvas obtidas, ajustadas pelo modelo estatístico linear generalizado (regressão linear ou R^2), observou-se que após 18,4 h o queijo embalado com o filme PVCE0 já apresentava a contaminação máxima determinada pela legislação. Já para os queijos embalados com os filmes PVCE20 e PVCE40, o tempo foi de 47,6 h e 67,9 h respectivamente.

O filme PVCE40 foi o mais eficaz em conter a contaminação microbiana ao mantê-la nos limites aceitáveis por um maior período, o qual foi aproximadamente quatro vezes mais eficiente quando comparado a embalagem sem eugenol.

A vida de prateleira dos queijos contaminados com *E. coli* apresentou a mesma ordem de eficiência do modelo sem contaminação em relação aos filmes utilizados, de acordo com a Figura 2.

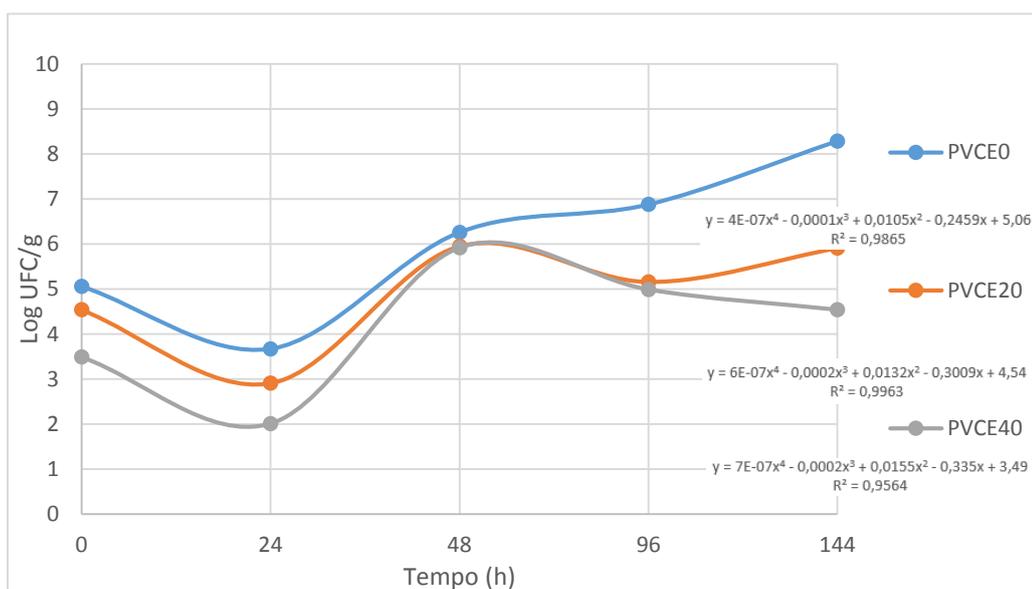


Figura 2. Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar contaminados com *Escherichia coli* embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.

Adotando novamente o modelo estatístico de regressão linear, pode-se mensurar e comparar a ação das embalagens no queijo contaminado. O filme PVCE40 demonstrou-se aproximadamente três vezes mais eficaz que o filme PVCE0 e uma vez e meia em relação ao filme PVCE20.

A contagem inicial de microrganismos superou os valores estipulados pela legislação na ordem de cem vezes, logo não foi possível estimar a vida de prateleira pela quantificação de microrganismos, no entanto, nota-se a nítida diferença entre os tratamentos, destacando a atividade do eugenol, presente nas embalagens a base de PVC.

O comportamento do queijo tipo Cheddar contaminado com *S. aureus* não apresentou reduções na contagem de microrganismos, como pode ser observado na Figura 3. Novamente o filme PVCE40 destacou-se como o mais eficiente entre os avaliados, capaz de reduzir em duas vezes a contaminação quando relacionado ao filme sem adição de eugenol.

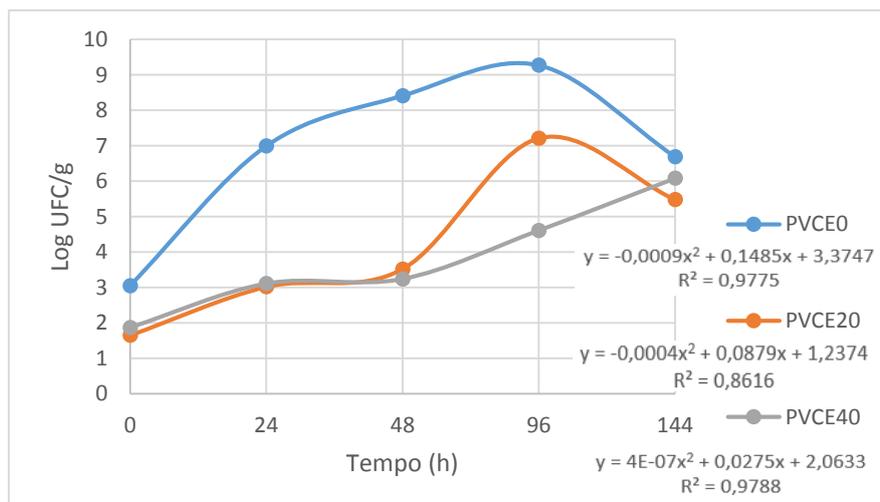


Figura 3. Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar contaminados com *Staphylococcus aureus* embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.

As análises da vida de prateleira do queijo Cheddar adicionado de *S. aureus* e *E. coli* em conjunto apresentaram um comportamento diferenciado, como pode ser observado na Figura 4.

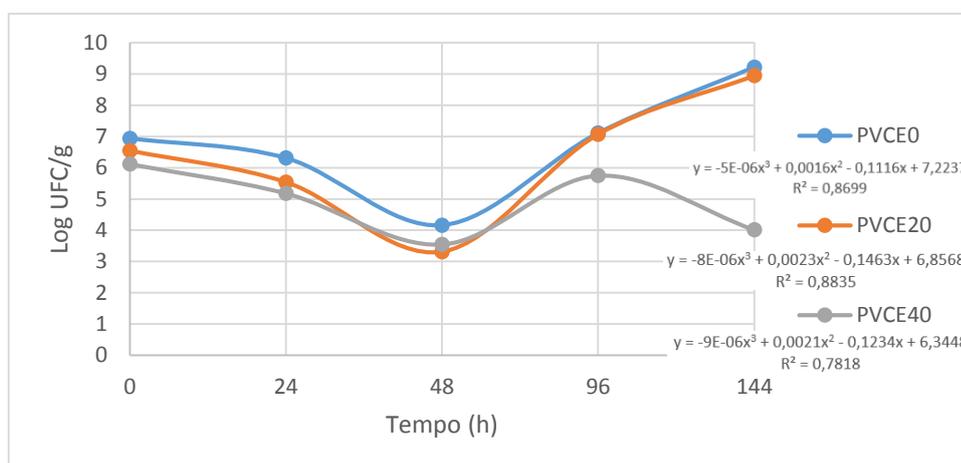


Figura 4. Contagem Padrão em Placa de microrganismos (Log UFC/g) em função do tempo das amostras de queijo tipo Cheddar contaminados com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* embalados com os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40, média das duas repetições.

No ensaio com os microrganismos contaminantes em conjunto, observa-se uma pequena diferenciação na ação dos filmes no intervalo de tempo de 0 h às 48 h, mantendo valores aproximados e obedecendo um mesmo comportamento. No entanto, o filme PVCE40 destaca-se a partir das 96 h, demonstrando novamente sua maior efetividade, capaz de reduzir em mais de cem vezes a contaminação inicial imposta.

A relação entre a efetividade dos filmes, ressalta uma eficiência duas vezes e meia maior para o filme PVCE40 em relação ao demais filmes.

Os quatro ensaios propostos demonstram a ação do eugenol sobre o alimento, mesmo em condições extremas de contaminação, sendo o responsável pela redução na carga microbiana quando comparado às embalagens sem o princípio ativo.

O aumento na concentração do eugenol na embalagem promoveu uma maior eficiência na redução microbiana, a qual alcançou níveis quatro vezes melhores na redução da atividade das bactérias.

3.7 - Perfis de FTIR e Fluorescência dos reagentes e produtos utilizados

Com a proposta de se elaborar uma metodologia para detecção de microrganismos por técnicas ópticas de fluorescência, necessitou-se de parâmetros para caracterização das amostras.

Primeiramente, realizou-se as análises dos espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier no eugenol puro e nos filmes elaborados (puros ou incorporados com eugenol), de acordo com as Figuras 5 e 6.

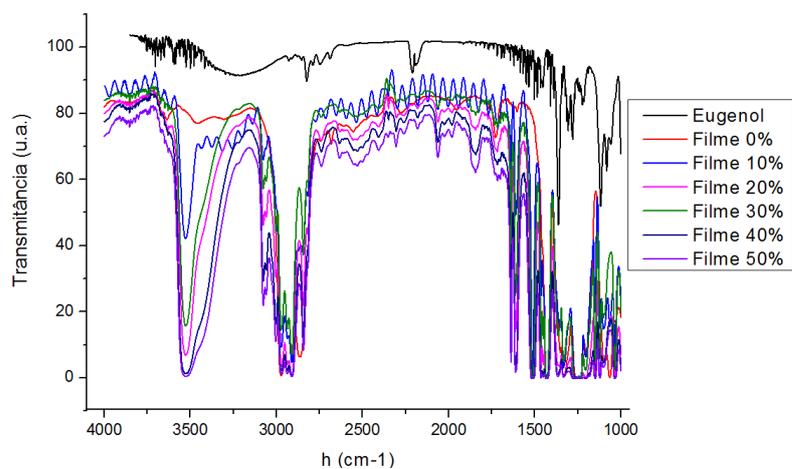


Figura 5. FTIR das amostras de eugenol puro e filmes nas concentrações de 0% (PVC Puro), 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de eugenol na matriz polimérica de PVC.

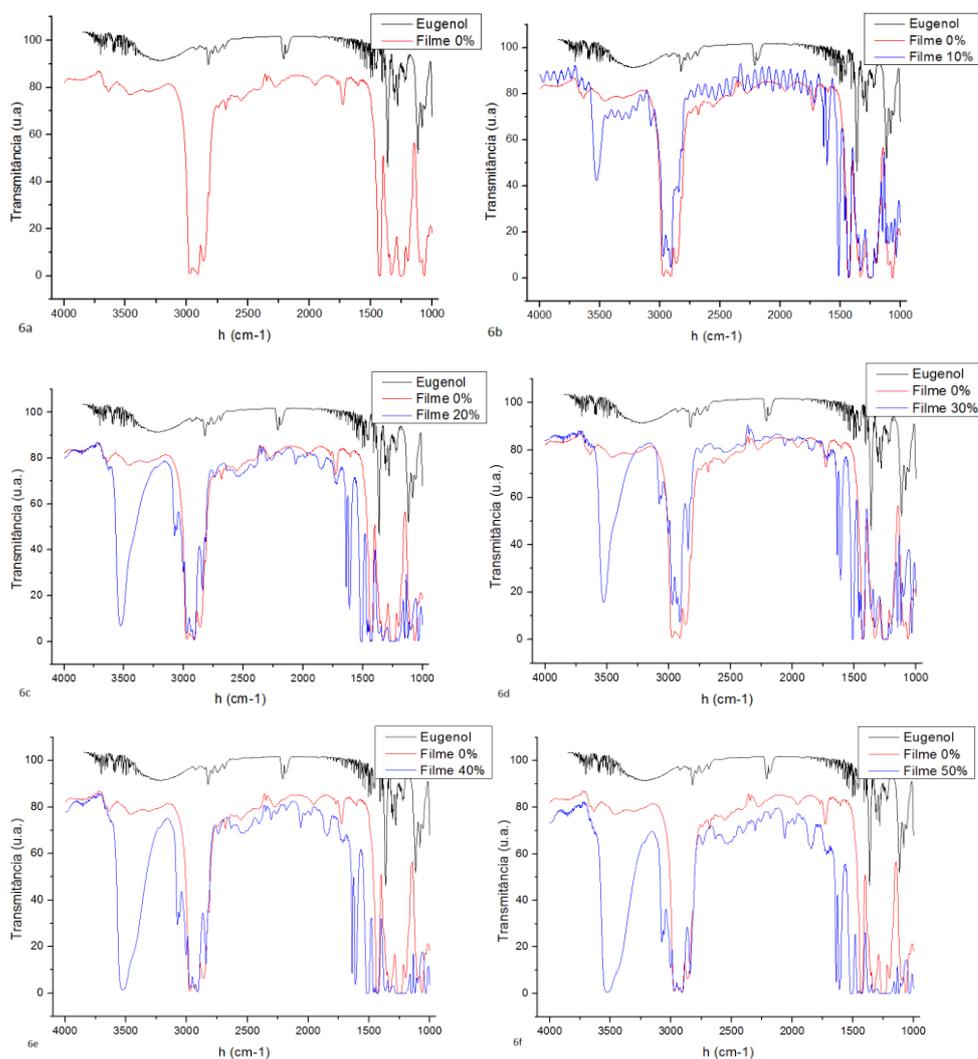


Figura 6. FTIR do eugenol (99% de pureza) e do filme de PVC puro (0%) comparados aos filmes de PVC incorporados com eugenol a 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (m/m).

Os espectros de FTIR do filme PVCE0 apresenta bandas estreitas e com forte intensidade na região 1430 a 1050 cm^{-1} , região característica dos haletos de alquila, ou seja, as ligações simples entre Carbono e Cloro (C-Cl) características do Policloreto de Vinila (PVC). A presença das ligações Carbono-Hidrogênio evidencia-se entre 3000 a 2700 cm^{-1} . (Lopes, 2004)

O eugenol apresentou bandas estreitas e de média intensidade na região entre 3360 a 3030 cm^{-1} , caracterizando a parte fenólica de sua molécula. A visualização da função éter no espectro pode ser observada pelos picos estreitos e de média intensidade entre 1370 a 1075 cm^{-1} , demonstrando as principais funções da molécula de eugenol.

Os espectros de transmitância por FTIR dos filmes incorporados com eugenol apresentam regiões distintas quando comparados ao filme sem eugenol e ao eugenol puro. Há um aumento de algumas bandas de transmitância que variam proporcionalmente ao aumento da concentração de eugenol nos filmes.

O anel fenólico característico na região entre 3650 a 3100 cm^{-1} evidencia-se com o aumento na concentração de eugenol, o mesmo ocorre em 1170 a 1150 cm^{-1} com a função éter.

A ligação dupla entre carbonos presente na molécula de eugenol, pouco evidenciado em seu espectro, destacou-se nos filmes incorporados, acompanhando o aumento proporcional da concentração do princípio ativo nas embalagens.

Houve, portanto, a incorporação do eugenol na matriz de PVC, evidenciada pela presença de novos picos formadores de outras ligações.

Foi realizado, também, a caracterização das amostras por espectro fluorescência, de acordo com as Figuras seguintes.

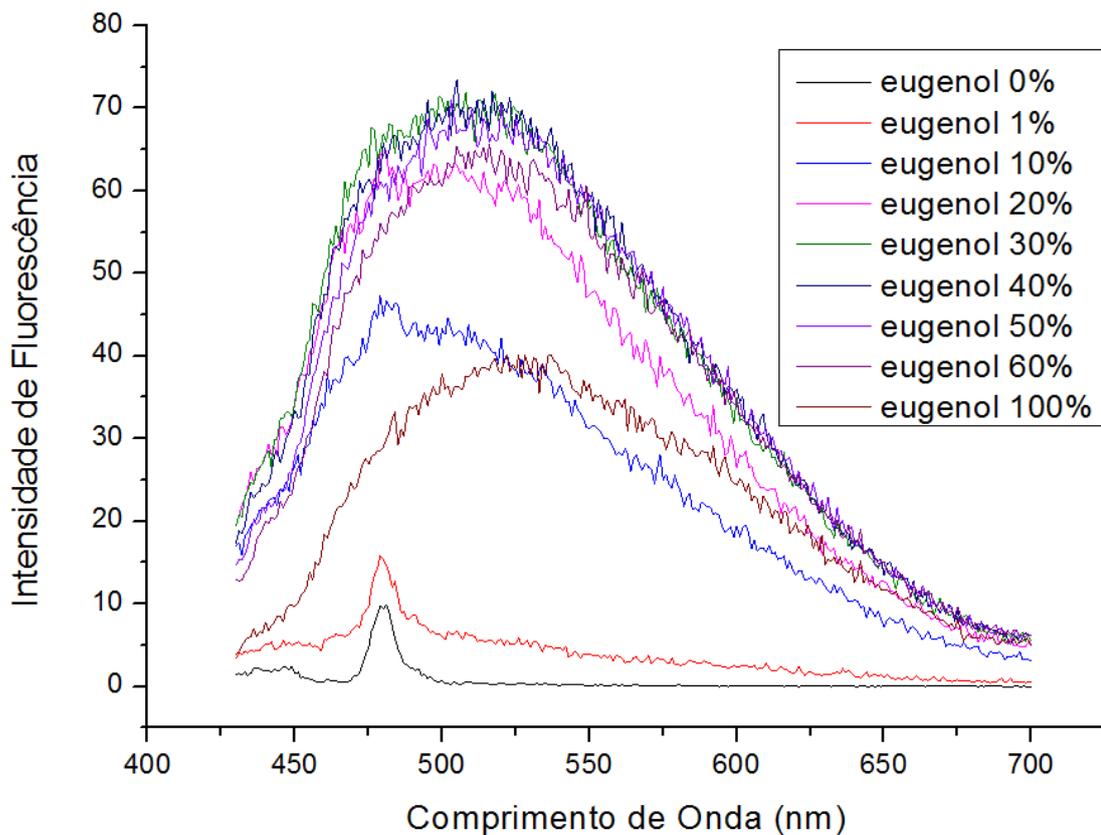


Figura 7. Espectro de fluorescência do eugenol nas concentrações variando entre 0 e 100%, diluídos em etanol, excitados a 405 nm.

A avaliação da fluorescência do eugenol demonstrou que há um aumento em sua intensidade, quando se considera a variação de 0 a 40%, ponto máximo de intensidade. Com o aumento da concentração, observa-se uma supressão da fluorescência, a partir da concentração de 50% até o eugenol puro (100%).

Para os filmes incorporados com eugenol, utilizou-se o espectro fluorímetro portátil, obtendo os gráficos de intensidade de acordo com a Figura 8.

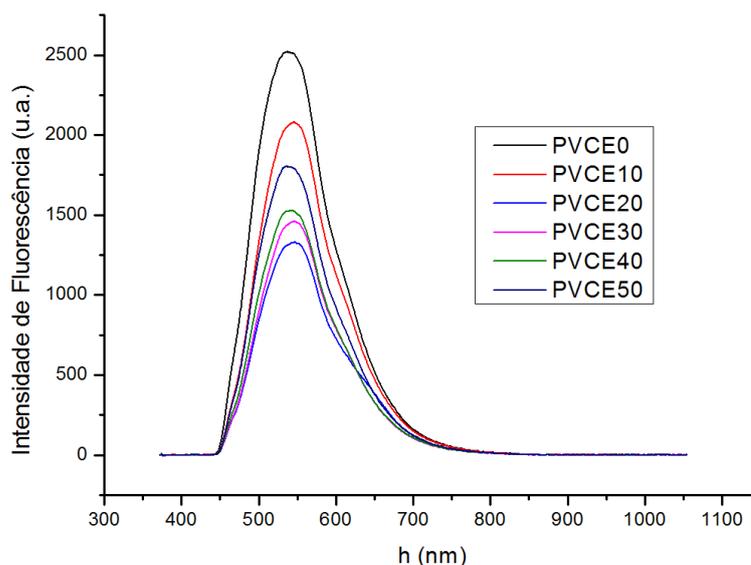


Figura 8. Perfis de fluorescência dos filmes incorporados com eugenol, submetidos a excitação a 405nm.

A Figura 8 demonstra que os filmes de PVC puro apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparados aos filmes com eugenol, observando uma redução gradual na fluorescência entre os filmes PVCE0, PVCE10 e PVCE20.

Ocorreu, então, uma inversão, a qual retratou um aumento na fluorescência acompanhando o aumento na concentração de eugenol, do filme PVCE20 ao filme PVCE50.

Ao se analisar fluorescência dos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093, quando excitados a 405 nm utilizando o espectro fluorímetro de bancada, observa-se a diferenciação quanto à resposta de emissão de fluorescência, de acordo com a Figura 9.

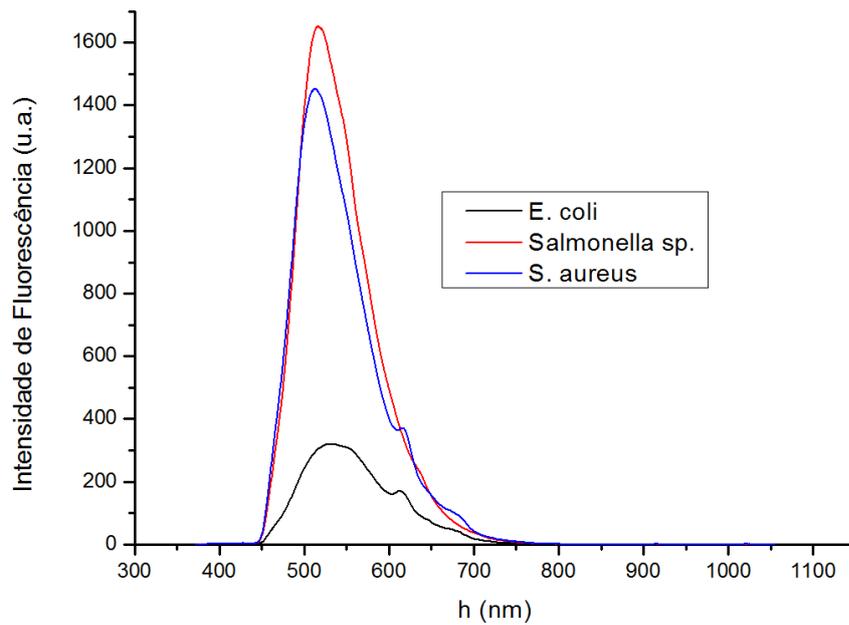


Figura 9. Perfis de fluorescência das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19093 quando excitadas a 405 nm.

A bactéria *E. coli* possui picos de fluorescência nas regiões de 532 nm e 615 nm, já *S. aureus* apresenta picos em 512 nm, 615 nm e 681 nm, diferenciando da *Salmonella* sp. que apresenta apenas um pico máximo de fluorescência em 517 nm.

O comportamento da fluorescência do queijo Cheddar foi analisada com o espectro fluorímetro de bancada sob excitação de 405 nm, como pode ser observado na Figura 10.

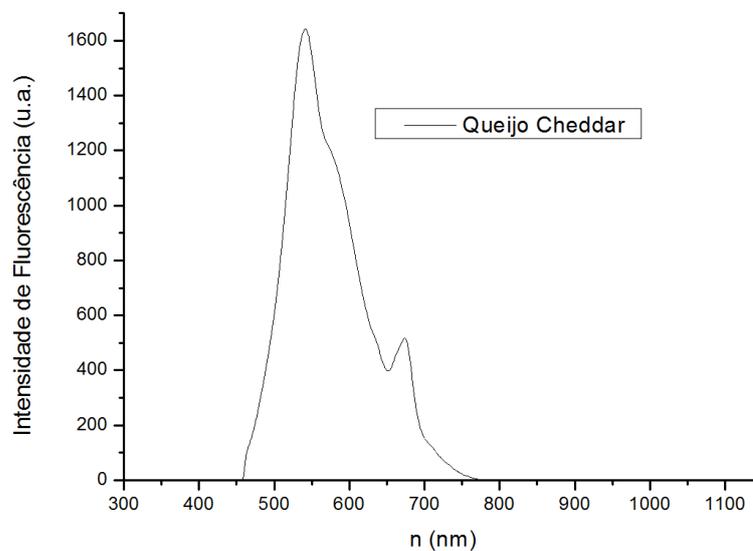


Figura 10. Perfil de fluorescência do queijo Cheddar, excitado a 405 nm.

A intensidade de fluorescência ocorreu de 457 nm a 773 nm, na qual ocorre a presença de dois picos nítidos nas regiões de 541 nm e 673 nm, havendo ainda uma pequena banda alargada em 577 nm.

3.8 - Análise dos espectros de Fluorescência dos filmes elaborados e do queijo tipo Cheddar em relação à sua vida de prateleira

As análises de fluorescência foram realizadas simultaneamente às análises microbiológicas (Contagem Padrão em Placa). A variação na intensidade de fluorescência foi monitorada ao longo do tempo para cada modelo de vida de prateleira avaliado para cada embalagem utilizada em cada modelo experimental. Os resultados foram separados por tratamentos e podem ser visualizados nas figuras seguintes.

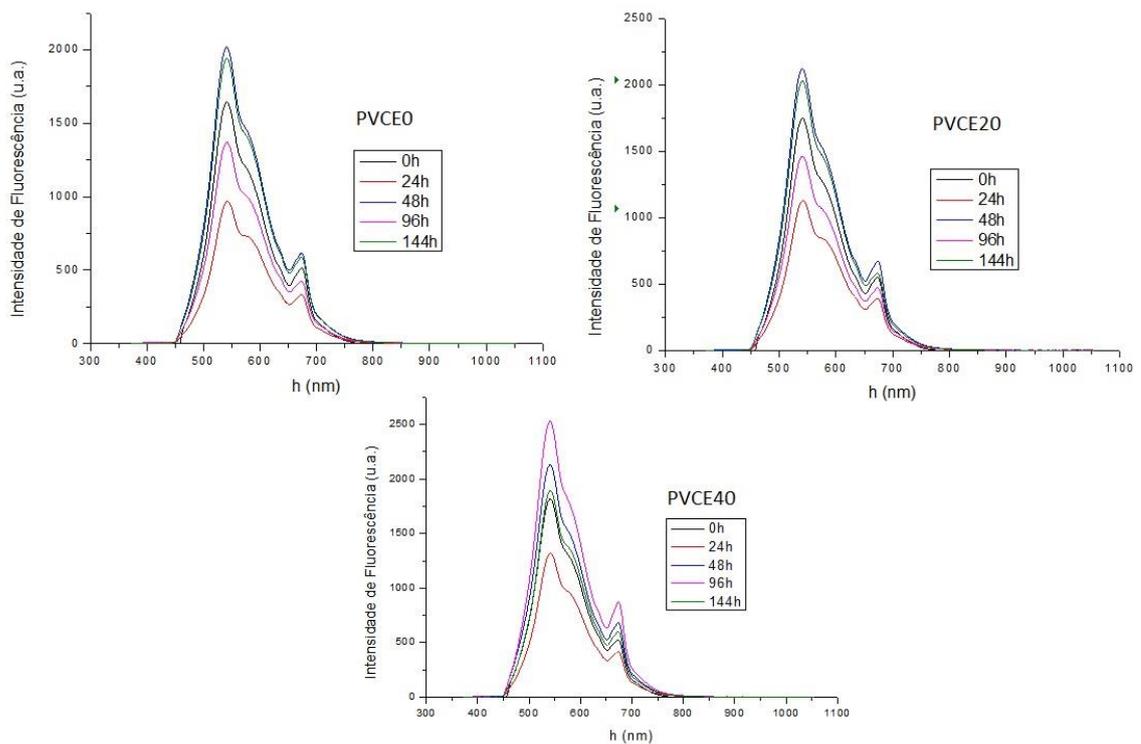


Figura 11. Espectros de fluorescência do queijo Cheddar, com sua microbiota natural, ao longo do tempo, excitados a 405 nm, para os filmes PVCE0, PVCE20 e PVCE40.

Observa-se um mesmo padrão comportamental dos espectros de fluorescência do queijo Cheddar ao longo do tempo para cada filme utilizado. A presença de três picos condiz com o espectro do queijo puro, observados em 540 nm, 580 nm e 673 nm.

Para os demais modelos experimentais abordados, inoculados com *E. coli*, *S. aureus* e as duas bactérias conjuntas, evidenciou-se o mesmo modelo comportamental, diferindo apenas nas variações e intensidades de cada espectro nos diferentes tempos avaliados. Essas variações foram calculadas pela integração das curvas, ou seja, representa a área abaixo de cada espectro, os quais podem ser observados na Figura 12.

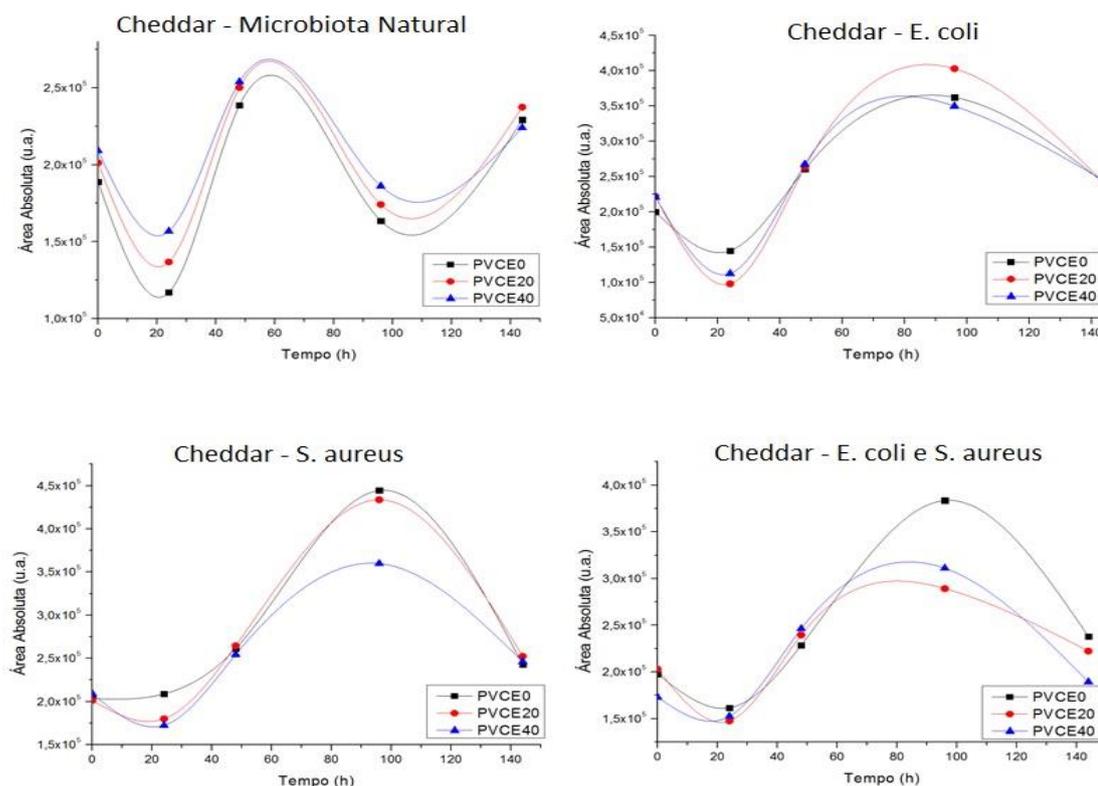


Figura 12. Perfil de fluorescência do queijo tipo Cheddar (valores de sua área absoluta) ao longo do tempo, quando excitado a 405 nm, sob ação dos filmes incorporados com eugenol (PVCE0, PVCE20 e PVCE40) em diferentes tratamentos.

A área absoluta dos espectros de fluorescência do queijo variou de forma ordenada para todos os filmes nos quatro tratamentos. Observou-se, ao longo do tempo, que houve alteração apenas nos valores da área absoluta, mas o comportamento dos gráficos manteve-se padronizado para cada tratamento isolado.

No caso do queijo com sua microbiota natural, a oscilação dos valores da área absoluta seguiram uma sequência alternada entre os valores em cada intervalo de tempo.

Os tratamentos com inoculação de bactérias apresentaram uma redução inicial na intensidade de fluorescência entre 0 h e 24 h (com exceção apenas do filme PVCE0 no

tratamento com *S. aureus*), um aumento nos valores das 24 h às 96 h e uma nova redução às 144 h.

A inoculação dos microrganismos foi responsável pelas alterações na fluorescência do queijo nos tempos de 96 h e 144 h. Esses tempos foram responsáveis pelos maiores valores de contaminação encontrados nos queijos, conseqüentemente os tempos analisados com as maiores alterações no alimento.

Os mecanismos de modificação da fluorescência e sua relação com a variação da intensidade dos espectros não foram avaliados.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficácia do eugenol frente aos microrganismos foi comprovada através da CIM, resultados que reforçam seu uso como agente antimicrobiano natural. Associado às embalagens a base de PVC, o eugenol demonstrou atividade antimicrobiana, através das técnicas de antibiograma em bactérias Gram Positivas e Gram Negativas, com maior eficiência nas cepas de *Salmonella* sp. ATCC 13076 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Nos testes simulados da vida de prateleira de queijo tipo Cheddar, a eficiência antimicrobiana do eugenol foi novamente comprovada, destacando-se em todos os modelos analisados as embalagens com 40 % de eugenol (m/m), as quais provocaram as maiores reduções decimais no controle do desenvolvimento microbiano.

As análises ópticas do espectro na região do infravermelho, realizadas nos reagentes e embalagens elaboradas, demonstraram a incorporação do eugenol na matriz polimérica do PVC, pois se observou a presença das ligações químicas específicas do eugenol nos filmes poliméricos.

No entanto, o eugenol incorporado às embalagens não está totalmente ligado ao PVC, pois foi observado sua migração e formação de halos de inibição microbiana nos antibiogramas.

Os espectros de fluorescência dos queijos ao longo do tempo, demonstraram uniformidade em seu comportamento. Ocorreu apenas a diferenciação do queijo Cheddar com sua microbiota natural dos queijos inoculados com bactérias (*E. coli* e *S. aureus*). Não foram observadas relações diretas entre as análises da contagem microbiana (UFC/mL) com os valores da área absoluta dos espectros de fluorescência.

REFERÊNCIAS

Blaszyk M, Holley RA (1998) Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology* 39:175-183.

Brasil, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

Bush, K., G. A. Jacoby, A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211-1233.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S21 Wayne, PA, 2011

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308–316.

Friedman, M., P.R. Henika, R.E. Mandrell. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65: 1545-1560.

Ghosh R., Nadiminty N., Fitzpatrick J. E., Alworth WL, Slaga TJ, Kumar AP (2005) Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280:5812-5819.

IBRE (Instituto Brasileiro de Economia) e FGV (Fundação Getúlio Vargas). Estudo macroeconômico da indústria brasileira de embalagem. Pesquisa encomendada pela ABRE (Associação Brasileira de Embalagens), primeiro semestre de 2013.

Jordán, M.J.; Lax, V.; Rota, M.C.; Lorán, S.; Sotomayor, J.A. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control.*, v. 30, 2013.

Lopes, W. A., Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 4, 670-673, 2004.

López, P. et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n.17, p. 6939-6946, 2005.

Maquixim. Reciclagem de PVC pós-consumo no Brasil. Pesquisa encomendada ao Instituto do PVC. 2009/2010.

Olasupol, N.A., D.J. Fitzgerald, M.J. Gasson and A. Narbad. 2003. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *LAM 36*: 448–451.

Oliveira, Rosilene Aparecida de et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Rev. bras. farmacogn*, João Pessoa, v. 19, n. 3, Sept. 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000500020&lng=en&nrm=iso>. access on 18 Nov. 2010. doi: 10.1590/S0102-695X2009000500020.

Pei R.S, Zhou F, Ji B.P, Xu J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *J Food Sci*. 2009 Sep;74(7):M379-83. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x.

Shaik Mahaboob Ali, Aleem A Khan, Irshad Ahmed, M Musaddiq, Khaja S Ahmed, H Polasa, L Venkateswar Rao,1 Chittoor M Habibullah, Leonardo A Sechi, and Niyaz Ahmed. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005; 4: 20. Published online 2005 December 21. doi: 10.1186/1476-0711-4-20

Silva, M.T.N.; Ushimaru, P.I.; Barbosa, L.N.; Cunha, M.L.R.S.; Fernandes Junior, A.; *Rev. Bras. Plantas Med*. 2009, 11, 257.

Sivasothy Y., Chong W. K., Hamid A., Eldeen I. M., Sulaiman S. F., Awang K.; *Food Chem.*, 2011, 124, 514; Bezic N., Skocibusic M., Dunkic V., Radonic A.; *Phytother .Res*. 2003, 17, 1037.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe., L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26, 118–122.

Soares, N.F.F. et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. *Revista Ceres*, v.56, p.370-378, 2009.

Tippayatum P., Chonhanchob V., Kasetsart J. Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria (*Nat. Sci.*) 41 : 319 - 323 (2007)

Trajano V.N., Lima E.O., Souza E.L., Travassos A.E.R. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 29(3): 542-545, jul.-set. 2009

Wang C, Zhang J, Chen H, Fan Y e Shi Z. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinérea*. *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, 3, 137-143 (2010). Copyright by the Brazilian Phytopathological Society. Printed in Brazil www.sbfito.com.br

Normas para submissão de Artigos

Use of word processing software

General

Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Article structure Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information • Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate

file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge,

that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the

publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf . Accessed 14.02.11. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and

descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not

p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Anexo II – Tabelas Gerais de Resultados

Tabela I: CIM do eugenol em relação às bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella sp.*.
Média em triplicata e três repetições.

Resultados MIC		ug/mL	
<i>E. coli</i>	1	29,75	*
	1	29,75	*
	1	29,75	*
	2	29,75	*
	2	29,75	*
	2	14,875	*
	3	59,5	*
	3	29,75	*
	3	14,875	*
	Media	29,75	

Resultados MIC		ug/mL	
<i>Salmonella sp.</i>	1	14,875	*
	1	14,875	*
	1	14,875	*
	2	29,75	*
	2	14,875	*
	2	29,75	*
	3	59,5	*
	3	29,75	*
	3	14,875	*
	Media	24,79167	

Resultados MIC		ug/mL
<i>S. aureus</i>	1	14,875
	1	14,875
	1	14,875
	2	14,875
	2	14,875
	2	29,75
	3	14,875
	3	14,875
	3	14,875
	Media	16,52778

Observação: resultados comprovados através do plaqueamento das amostras negativas.

Tabela II: Resultados dos antibiogramas, em triplicata e três repetições.

<i>E. coli</i>		0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
	1	+++	+++	++	+	0	0	2
	1	+++	+++	++	+	0	0	1,9
	1	+++	+++	++	+	0	0	1,9
	2	+++	++	++	+	0	1,3	1,6
	2	+++	++	++	+	0	1,3	1,8
	2	+++	++	++	+	0	1,4	1,8
	3	+++	++	++	+	0	1,2	1,9
	3	+++	++	++	+	0	1,2	2,2
	3	+++	++	++	+	0	1,4	2
Media							1,3	1,9

<i>Salmonella sp.</i>		0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
	1	++	0	0	0	1,4	1,6	2,6
	1	++	0	0	0	1,4	1,6	2,2
	1	++	0	0	0	1,3	1,7	2,6
	2	++	0	0	0	1	1,6	1,9
	2	++	0	0	0	1,1	1,6	2,2
	2	++	0	0	0	1	1,5	2,4
	3	++	+	0	0	1	1,4	2,4
	3	++	+	0	0	1	1,4	2,4
	3	++	+	0	0	1	1,4	2,2
Media						1,133333	1,533333	2,322222

<i>Staphylococcus</i>		0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
	1	+++	+	+	+	0	1	1,9
	1	+++	+	+	+	0	1,2	1,8
	1	+++	+	+	+	0	1,1	1,8
	2	+++	++	+	0	0	1,3	1,6
	2	+++	+	+	0	0	1,4	1,6
	2	+++	+	+	0	0	1,3	1,8
	3	+++	+	+	0	0	1,2	1,9
	3	+++	++	+	0	0	1,3	1,7
	3	+++	+	+	0	0	1,3	1,7
Media							1,233333	1,755556
<i>Pseudomonas</i>		0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%

	1	++	0	0	0	1	1,2	1,8
	1	++	0	0	0	1	1,3	1,6
	1	++	0	0	0	1,1	1,3	1,5
	2	++	0	0	0	1	1,3	1,2
	2	++	0	0	0	1	1,3	1,3
	2	++	0	0	0	1	1,3	1,5
	3	++	+	0	0	1	1,2	1,6
	3	++	+	0	0	1	1,2	1,8
	3	++	+	0	0	1	1,3	1,4
	Media					1,011111	1,266667	1,522222

<i>Klebsiella</i>		0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
	1	+++	+	+	+	0	1	1,5
	1	+++	+	+	+	0	1	1,6
	1	+++	++	+	+	0	1	1,8
	2	+++	++	+	0	0	1	1,5
	2	+++	+	+	0	0	1,1	1,1
	2	+++	+++	+	0	0	1,2	1,1
	3	+++	+	+	0	0	1,1	1,3
	3	+++	++	+	0	0	1,1	1,6
	3	+++	+	+	0	0	1	1,4
	Media					0	1,055556	1,433333

<i>Enterococcus</i>		0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%
	1	+++	+++	++	+	+	1,1	1,1
	1	+++	+++	++	+	+	1	1,1
	1	+++	+++	++	+	+	0	1,1
	2	+++	+++	++	+	+	1,1	1,1
	2	+++	+++	++	++	0	0	1
	2	+++	+++	++	++	0	1,1	1
	3	+++	+++	++	++	0	1,1	1
	3	+++	+++	++	+	0	0	1,1
	3	+++	+++	++	+	+	1	1
	Media						0,711111	1,055556

+++	Crescimento de massa celular embaixo dos filmes em grande quantidade
++	Crescimento de massa celular embaixo dos filmes em média quantidade
+	Crescimento de massa celular embaixo dos filmes em pequena quantidade
0	Sem crescimento de massa celular, sem formação de halos
Halos medidos em cm.	

Tabela III: Log da contagem padrão em placas ao longo do tempo.

<i>E. coli</i>	0	24	48	96	144
0%	5,06	3,67	6,26	6,88	8,29
20%	4,54	2,91	5,95	5,16	5,91
40%	3,49	2,01	5,92	4,99	4,54

Cheddar	0	24	48	96	144
0%	2,49	2,43	4,97	6,12	8,43
20%	1,48	2,01	3,82	4,54	5,01
40%	1,69	1,95	2,46	3,77	4,54

<i>S. aureus</i>	0	24	48	96	144
0%	3,05	6,99	8,41	9,27	6,69
20%	1,65	3,02	3,52	7,21	5,48
40%	1,87	3,11	3,24	4,61	6,08

S.a. + E.c.	0	24	48	96	144
0%	6,94	6,31	4,16	7,11	9,22
20%	6,55	5,54	3,31	7,07	8,95
40%	6,12	5,18	3,54	5,75	4,01