

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE REVESTIMENTOS  
NATURAIS NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA  
RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO**

HENRIQUE CEZAR ALVES

São Carlos

**2015**

# **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE REVESTIMENTOS NATURAIS NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia - Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Doutor em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos

**2015**

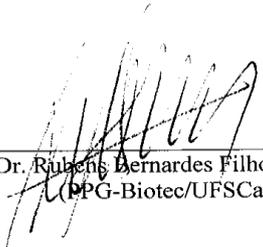
**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE REVESTIMENTOS NATURAIS**  
**NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E**  
**EMBALADA A VÁCUO**

**HENRIQUE CEZAR ALVES**

Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia

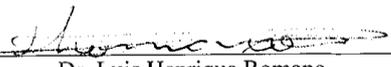
**Aprovado em: 30/10/2015**

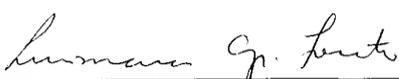
**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho - Orientador  
(PPG-Biotec/UFSCar)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos David Ferreira  
(EMBRAPA)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt  
(UNICAMP)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Henrique Romano  
(UFSCar)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Lucimara Aparecida Forato  
(EMBRAPA)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

*“Se não fossem as gotas d'água, a fonte não existiria.”*

*Francisco Cândido Xavier*

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã, meu sobrinho/afilhado, Lorenzo, aos meus avós, tios, primos e amigos, que sempre estiveram comigo, nos bons e maus momentos. Dedico também, em especial, ao meu querido tio e padrinho, Florisvaldo Geminiano Joaquim, uma das pessoas de melhor caráter e mais generosas que eu tive o prazer de conviver. Aonde quer que ele esteja, tenho certeza que está feliz por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a meus pais, Lauro e Marielza, por terem me concedido a vida.

Aos meus orientadores, prof. Dr. Rubens Bernardes Filho e profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, pelo auxílio, confiança e apoio na execução deste trabalho.

À minha irmã, Daniela, todos os familiares, amigos e colegas, que sempre me apoiaram para que este trabalho fosse possível.

À Dra. Rejane Goy e ao Dr. Humberto Brandão, por me ensinarem a preparar o extrato e as nanopartículas de própolis.

À toda a equipe da Embrapa Instrumentação, em especial à Silviane, Joana, Viviane, Adriana, Edilson Gabriel, Alice, Marcelo e Luiz Mattêo, por todo o suporte e ajuda.

Aos profs. Drs. José Teixeira, António Vicente e à Dra. Joana Martins pela co-orientação, durante o estágio doutoral realizado na Universidade do Minho – Portugal.

A todos os colegas do Laboratório de Indústria e Processo – LIP, da Universidade do Minho, por todo o auxílio e companheirismo.

À Dra. Renata Nassu, ao Dr. Rymer Tullio e ao Dr. Avelardo Ferreira, da Embrapa Pecuária Sudeste, pelas técnicas que me ensinaram e que foram fundamentais na realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Pedro de Souza e ao Rodrigo Souza (Roko), da FCAV/Unesp de Jaboticabal, pelo auxílio nas análises de oxidação lipídica (TBARS).

À Milene Foschini, pela ajuda com as análises estatísticas.

À CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche concedidas.

# AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE REVESTIMENTOS NATURAIS NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO

## RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de carne bovina *in natura*, o que em 2014 representou cerca de US\$23,31 bilhões em Valor Bruto da Produção (VBP) em um mercado de US\$62,97 bilhões por ano, gerando cerca de 7 milhões de empregos. Os parâmetros mais avaliados em carne, podem ser subdivididos em físico-químicos como temperatura (T), atividade de água (Aw), potencial redox (Eh), potencial hidrogeniônico (pH), maturação ou tenderização, método de cocção e sensoriais como coloração, maciez, textura, suculência e *flavour* - combinação entre aroma e sabor. Como 75% da composição muscular é água, na conversão de músculo em carne há uma liberação de 2% a 5% dessa água total, devido à evaporação e exsudação, caracterizando uma elevada Aw. Esta solução obtida é rica em aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, açúcares e apesar de embalagem a vácuo ser considerada eficiente, na conservação de carne bovina *in natura* resfriada, um grave problema, conhecido como *blown pack* ou tufamento de embalagem, pode ocorrer caso a contaminação microbiológica seja significativa ou não se respeite a temperatura mínima de resfriamento ( $4 \pm 2$  °C). Portanto, a redução da proliferação microbiana em carne é necessária. Com este intuito, foi utilizado neste trabalho um revestimento a base de quitosana a 1% (m/m) e glicerol a 0,5% (m/m) que pode ser aplicado para a proteção de alimentos, especialmente como filmes e revestimentos comestíveis. Paralelamente, foram avaliados os efeitos de extrato (EEP) e nanopartículas de própolis (NPs), frente a alguns gêneros bacterianos comumente encontrados em carne fresca *in natura*. A permeabilidade do filme, produzido, respectivamente aos gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> foi de  $1,53 \pm 0,73 \cdot 10^{-15} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  e de  $1,20 \pm 0,06 \cdot 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$ , comparativamente maior, em relação aos trabalhos citados. Esse filme possui alto teor de umidade e baixa solubilidade relativos, o que é interessante para aplicação em carne, pois mantém sua propriedade de barreira e integridade, mesmo sob elevada umidade e possível atividade de água. Com relação à coloração (Hue) das amostras de contrafilé (*Longissimus dorsi*) utilizadas nestes experimentos, no 7º dia houve uma pequena desvantagem para as amostras revestidas e a vácuo em relação às que não estavam a vácuo. Porém, no 14º dia o brilho (Croma) das amostras nesta mesma condição foi superior ao das outras amostras e não houve diferença significativa na cor. Portanto, esta condição ainda pode ser considerada mais vantajosa, quando se deseja estender o tempo de prateleira. O revestimento em questão, melhorou a capacidade de retenção de água (CRA) de amostras de carne, o que auxilia na desejada suculência do produto. Além disso, inibiu o crescimento de enterobactérias, bactérias ácido-láticas (BALs) e psicotróficas totais, o que certamente poderá aumentar o tempo de prateleira do produto. O EEP utilizado possui teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante relativamente elevados. Para todas as concentrações de EEP e NPs testadas, com todas as espécies bacterianas, obteve-se resultados melhores com as NPs.

Palavras-chave: quitosana, revestimento comestível, qualidade, tempo de prateleira, própolis

# NATURAL COATINGS EFFECTS ASSESSMENT ON PRESERVATION OF CHILLED VACUUM PACKED BEEF

## ABSTRACT

Brazil is the world's second largest producer and exporter of bovine fresh meat, what in 2014 accounted for about US\$23.31 billion in Gross Value of Production (GVP) in a market of US\$62.97 billion per year, generating about 7 million jobs. The most evaluated parameters about meat, can be divided into physical-chemical like temperature (T), water activity ( $A_w$ ), redox potential (Eh), hydrogen ion potential (pH), maturation or tenderization, cooking method and sensorial like color, softness, texture, juiciness and flavor - combination of aroma and taste. As 75% of muscle composition is water, in the muscle conversion into meat there is a release of 2 to 5% of this total water, due evaporation and exudation, characterizing a high  $A_w$  value. This obtained solution is rich in amino acids, peptides, nucleotides, sugars and although the vacuum packaging is considered an efficient way to preserve *in natura* chilled beef, a serious problem, known as blown pack may occur if microbial contamination is significant or not respect the cooling minimum temperature ( $4 \pm 2$  °C). Therefore, the reduction of microbial proliferation in food is necessary. The goal of this work was to use a coating based on chitosan at 1% (w/w) and glycerol at 0.5% (w/w) which can be applied to food protection, especially as edible films and coatings. In parallel, was evaluated the effects of extract (PEE) and propolis nanoparticles (PNs) on some bacterial genders commonly found in fresh meat *in natura*. The permeability of the film produced in this work, respectively to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gases was  $1.53 \pm 0.73 \cdot 10^{-15} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  and  $1.20 \pm 0.06 \cdot 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$ , relatively larger, when compared to literature. This film has relatively high moisture content and low solubility, what is interesting for application in meat, because it keeps its barrier property and integrity, even under high humidity and possible high  $A_w$ . Regarding the color (Hue) of meat samples (*Longissimus dorsi*) used in this experiments, on the 7th day presented a small disadvantage of coated and vacuum samples relative to that were not vacuum. However, on the 14th day, brightness (Chroma) of the samples in this condition was better than the other samples and, there was no significant difference in color. Therefore, this condition yet can be considered more advantageous when we wish to extend the shelf life time. The coating developed in this work, improved water holding capacity (WHC) of meat samples, which helps the desired juiciness of the product. Besides that, this film inhibits the growth of enterobacteria, lactic acid bacteria (LABs) and total psychrotrophic, which certainly can increase the shelf life of the product. The used PEE has a relatively high phenolic content and antioxidant capacity. For all tested concentrations of PEE and PNs with all bacterial species, better results were obtained with PNs.

Keywords: chitosan, edible coating, quality, shelf life, propolis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela - 1 Formulações das soluções filmogênicas de quitosana .....	30
Tabela – 2 Médias das tensões superficiais das soluções filmogênicas de quitosana .....	43
Tabela 3 Médias dos ângulos de conato das soluções filmogênicas de quitosana.....	43
Tabela – 4 Médias dos coeficientes de adesão de cada formulação de gel de quitosana.....	44
Tabela – 5 Médias dos coeficientes de coesão de cada formulação de solução filmogênica de quitosana.....	44
Tabela - 6 Médias dos coeficientes de espalhamento de cada formulação de solução filmogênica de quitosana .....	44
Tabela - 7 Resultados da ANOVA para avaliação dos efeitos dos reagentes no We das soluções filmogênicas de quitosana.....	45
Tabela 8 – Médias e desvios-padrão (dp) dos valores de pH...51	
Tabela 9 - Médias e desvios-padrão (dp) de ângulos de Hue...54	
Tabela 10 - Médias e desvios-padrão (dp) de croma.....55	
Tabela 11 - Médias e desvios-padrão (dp) de CRA (%).....56	
Tabela 12 - Médias e desvios-padrão de TBARS.....58	
Tabela 13 - Médias ( $\ln \text{UFC.mL}^{-1}$ ) e desvios-padrão (dp) de todos os bioensaios.....63	
Tabela 14 - MICs e tamanho médio dos halos inibitórios de nanopartículas e extrato de própolis frente a 8 gêneros microbianos comumente presentes em carne bovina.....69	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização.....	23
Figura 2 - Esquema representativo das tensões interfaciais existentes num sistema trifásico, em que duas das fases estão condensadas..	24
Figura 3 – Frasco para ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.....	31
Figura 4 – Dessecador com ventoinhas para circulação de ar durante a realização de ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.....	32
Figura 5 – Câmara para determinação de permeabilidade gasosa em filmes.....	33
Figura 6 - Representações do sólido das cores pelo método CIE L*a*b* no espaço das cores. Imagem de Konica Minolta Sensing Americas.....	36
Figura 7 – Imagem em 2D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.....	48
Figura 8 – Imagem em 3D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.....	49
Figura 9 - Amostra de carne embalada a vácuo em PVC e não revestida no 21º dia de experimento .....	53
Figura 10 - Amostra de carne embalada sem vácuo em PVC e revestida no 21º dia de experimento.....	53
Figura 11 - Amostra de carne embalada a vácuo em PVC e revestida no 21º dia de experimento.....	54
Figura 12 – Placas de Petri contendo meio de cultura de MacConkey com crescimento de enterobactérias (A) e sem crescimento (B).....	60
Figura 13 - Imagem em 2D de nanopartículas de própolis obtida por MFA.....	67
Figura 14 - Imagem em 3D de nanopartículas de própolis obtida por MFA.....	67
Figura 15 – Exemplos de bioensaios de inibição com presença de halos de inibição; A) <i>S. aureus</i> e EEP; B) <i>E. helveticus</i> e NPs.....	70

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de Pareto indicando influência positiva para as variáveis ou interações delas cujas barras ultrapassam a linha vermelha tracejada.....	45
Gráfico 2 - Médias e desvios-padrão do We.....	46
Gráfico 3 – Médias e desvios-padrão do pH.....	50
Gráfico 4 - Médias e desvios-padrão de ângulo de Hue.....	51
Gráfico 5 - Médias e desvios-padrão de croma.....	52
Gráfico 6 - Médias e desvios-padrão de CRA (%)......	55
Gráfico 7 - Médias e desvios-padrão de TBARS.....	57
Gráfico 8 - Médias e desvios-padrão em In UFC.mL <sup>-1</sup> para Enterobactérias totais.....	59
Gráfico 9 - Médias e desvios-padrão em In UFC.mL <sup>-1</sup> para BALs totais.....	61
Gráfico 10 - Médias e desvios-padrão em In UFC.mL <sup>-1</sup> para Psicotróficas totais.....	62
Gráfico 11 – Cromatograma do extrato de própolis com compostos identificados.....	65
Gráfico 12 – Cromatograma dos compostos fenólicos padrão.....	65
Gráfico 13 – Determinação de diâmetro médio de nanopartículas de própolis por EDL.....	66
Gráfico 14 – Determinação do tamanho de nanopartículas de própolis por MFA.....	68

## LISTA DE SIGLAS

AMC – ágar MacConkey

AMRS – ágar DeMan, Rogosa e Sharpe

ASB – ágar sangue base

ANOVA – Análise de variância

BALs – bactérias ácido-láticas

CIE - Comissão Internacional de Iluminação

CRA – capacidade de retenção de água

Dp – desvio-padrão

EDL - Espalhamento Dinâmico de Luz

EEP - extrato etanólico de própolis

MFA – microscopia de força atômica

MIC - concentração inibitória mínima

NPs - nanopartículas de própolis

NVNR – amostra de carne embalada sem vácuo e sem revestimento

NVRE – amostra de carne embalada sem vácuo e com revestimento

TBARS – análise de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

UFC – unidades formadoras de colônia

VANR – amostra de carne embalada a vácuo e sem revestimento

VARE - amostra de carne embalada a vácuo e com revestimento

## LISTA DE SÍMBOLOS

$a^*$  - coordenada vermelho/verde (+a indica vermelho e -a indica verde)

$b^*$  - coordenada amarelo/azul (+b indica amarelo e -b indica azul)

$\Delta P$  – pressão diferencial

$\gamma_L^d$  - interação dispersiva de um líquido puro

$\gamma_L^V$  - tensão superficial na interface líquido/vapor

$\gamma_S^d$  – interação dispersiva na superfície de um sólido

$\gamma_S^p$  - interação polar na superfície de um sólido

$\gamma_S^V$  - tensão superficial na interface sólido/vapor

$L^*$  - Luminosidade

$PCO_2$  – permeabilidade ao gás carbônico

$PO_2$  – permeabilidade ao gás oxigênio

$W_a$  – coeficiente de adesão

$W_c$  – coeficiente de coesão

$W_e$  – coeficiente de espalhamento

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS .....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.1 Determinação da tensão superficial da carne.....	29
3.2 Determinação de tensões superficiais de soluções filmogênicas de quitosana.....	29
3.3 Estudo das soluções filmogênicas de quitosana.....	30
3.4 Determinação de permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água.....	31
3.5 Determinação de permeabilidade do filme selecionado aos gases O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> .....	32
3.6 Determinação da espessura e das propriedades mecânicas de um filme de quitosana.....	34
3.7 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado.....	34
3.8 Caracterização de superfície, do filme selecionado por microscopia de força atômica (MFA).....	35
3.9 Determinação de pH de amostras de carne.....	35
3.10 Avaliação colorimétrica de amostras de carne.....	36
3.11 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA).....	37
3.12 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS).....	38
3.13 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> , bactérias ácido-lácticas (BALs) e psicrotróficas totais em amostras de carne.....	38
3.14 Síntese e caracterização de extrato e nanopartículas de própolis.....	39
3.14.1 Características da própolis.....	39
3.14.2 Síntese e caracterização de nanopartículas de própolis.....	41
3.15 Determinação da MIC de extrato e nanopartículas de própolis.....	42
3.16 Análises estatísticas.....	42

## SUMÁRIO

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
4.1 Caracterização da superfície da carne.....	43
4.2 Determinação de tensão superficial das soluções de filmes e da melhor formulação do filme de quitosana.....	43
4.3 Determinação de permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água.....	46
4.4 Determinação de permeabilidade do filme selecionado aos gases O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> .....	47
4.5 Determinação de espessura e de propriedades mecânicas de um filme de quitosana.....	47
4.6 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado.....	48
4.7 Caracterização de superfície do filme selecionado por microscopia de força atômica (MFA).....	48
4.8 Determinação de pH de amostras de carne.....	49
4.9 Avaliação colorimétrica de amostras de carne .....	51
4.10 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA).....	55
4.11 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS).....	56
4.12 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> bactérias ácido-lácticas (BALs) e psicrotróficas totais em amostras de carne.....	58
4.13 Caracterização das nanopartículas de própolis.....	63
4.13.1 Caracterização do extrato de própolis.....	63
4.13.2 Caracterização das nanopartículas de própolis.....	66
4.14 Determinação da MIC do extrato e das nanopartículas de própolis.....	68
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DE REVESTIMENTO COMESTÍVEL NA CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA RESFRIADA E EMBALADA A VÁCUO

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de carne bovina *in natura* e de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* – USDA, 2015), a produção brasileira deste produto, em 2014, foi de 9,723 milhões de toneladas (em equivalente carcaça), somente inferior à norte-americana, que é de 11,078 milhões de toneladas. Ainda de acordo com o USDA, em 2014 o Brasil exportou 1,909 milhões de toneladas, em equivalente carcaça, quantidade apenas inferior às 2,082 milhões de toneladas exportadas pela Índia. Portanto, a pecuária de corte no Brasil é um dos principais pilares do agronegócio brasileiro. Em 2014, o Valor Bruto da Produção (VBP) de carne foi de pouco mais de US\$23,31 bilhões, atrás apenas da produção de soja (BRASIL, 2015). A cadeia produtiva da carne movimenta US\$62,97 bilhões por ano, gerando aproximadamente 7 milhões de empregos (NEVES, 2012).

Em 2012, o Brasil exportou carne bovina para 142 países (BRASIL, 2013). Esse avanço, em grande parte, só foi possível devido a algumas conquistas obtidas, como as zonas livres de febre aftosa e a criação em 2002, do Sistema Brasileiro de Identificação de Origem de Bovinos e Bubalinos – SISBOV, com intuito de garantir a procedência e a tipificação das carnes bovina e bubalina, através da rastreabilidade (BRANDÃO, 2007).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, no ano de 2015, a expectativa é que a produção de carne bovina aumente a uma taxa de 2,1% ao ano e sendo assim, até 2025, a produção nacional de carne bovina será de 11,355 milhões de toneladas, um aumento de 23,3% no período. Com relação às exportações, a projeção é que aumentem de

2015 para 2025 a uma taxa de 3,3% ao ano, chegando ao total estimado de 2,883 milhões de toneladas, ou seja, um aumento esperado de 37,4% no período em questão.

O grande sucesso de toda essa cadeia produtiva está ligado à qualidade do produto, sobre a qual devem ser considerados os aspectos *ante mortem* e *post mortem*, sendo que os cuidados devem ter início durante a vida do animal, desde o manejo, controle da alimentação até os cuidados sanitários e o meio de transporte até o abatedouro (DELAZARI, 1977). Os aspectos *ante mortem* se restringem basicamente: à genética, ao sistema de criação (confinado ou extensivo), à alimentação, à idade ou à maturidade e estresse pré-abate.

O estresse pré-abate, no transporte de bovinos até o abatedouro, em geral, ocorre devido ao espaço para os animais ser insuficiente, o que gera um gasto adicional de energia, impactando a concentração do glicogênio muscular que pode ser parcial ou totalmente esgotada (FERGUSON *et al.* 2008). Por exemplo, de acordo com Andrade *et. al.* (2009), nas propriedades mais distantes e de difícil acesso, do Pantanal sul-mato-grossense, ainda predomina o transporte por comitiva até os centros de embarque fluvial ou rodoviário. Desta forma, os animais chegam ao abatedouro fadigados, famintos e estressados.

Os aspectos *post mortem* podem ser didaticamente subdivididos em físico-químicos e sensoriais, sendo que, dentre os físico-químicos, se encontram: resfriamento, estimulação elétrica, atividade de água (Aw), potencial redox (Eh), potencial hidrogeniônico (pH), maturação ou tenderização e método de cocção (FELÍCIO, 1997). Os sensoriais são: coloração, maciez, textura, suculência e flavor - combinação entre aroma e sabor (SARAIVA, 2008).

Após o abate do animal, seus músculos, tecidos e células passam por um complexo sistema de transformações conhecidas como *rigor-mortis*, no qual podem ser observadas mudanças físicas, bioquímicas e microbiológicas (FEITOSA, 1999). Em suma, o que ocorre é que os filamentos proteicos de actina e miosina, presentes no músculo, devido à ausência de adenosina trifosfato (ATP), se unem para formar cadeias rígidas de actomiosina, caracterizando o *rigor-mortis* (ERDÖS, 1943; BATE-SMITH E BENDALL, 1947, 1949). Estas

alterações fazem parte do processo conhecido como conversão dos músculos em carne.

Na conversão de músculo em carne, segundo Lawrie (1974, 1985), pelo fato de 75% da sua composição ser água, ocorre uma liberação, por evaporação e exsudação, em torno de 2% a 5% desta água, juntamente com aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e açúcares, o que caracteriza uma elevada *Aw*, termo criado para descrever a água livre e disponível nos alimentos, para o crescimento de micro-organismos e para que ocorram reações deteriorantes (DITCHFIELD, 2000).

Além da *Aw*, outros fatores que influenciam significativamente na qualidade da carne são o potencial redox (Eh) e o potencial hidrogeniônico (pH). O Eh de um alimento está relacionado com a sua composição química e com a tensão ou pressão parcial do oxigênio, durante o armazenamento (MOSSEL, 1994; OBBINGER, 1973; URBAIN, 1976). O efeito do Eh, sobre o crescimento microbiano, é o de prolongar a fase *lag* inicial (BARNES E INGRAM, 1956), ou seja, o período de adaptação ou readaptação, dos micro-organismos, às condições em que se encontra o substrato onde irão atuar, como por exemplo, a carne.

O pH *post mortem* de qualquer carne é determinado pela quantidade de ácido láctico, que é produzido a partir de glicogênio, durante a glicólise anaeróbica que ocorre nas células musculares, principalmente, pela ação de bactérias ácido-láticas. Esta produção de ácido láctico é capaz de fazer baixar o pH original do músculo, que era em torno de 7, para aproximadamente 5,5, por volta da vigésima quarta hora *post mortem* (FELÍCIO, 1997).

Este processo, essencial para amaciar e conservar o produto, pode não ocorrer caso, anteriormente ao abate, o animal sofra fadigas musculares, inanição ou estresse (LAWRIE, 2005) pois estes fatores acarretam, conseqüentemente, no esgotamento de glicogênio. Este tipo de situação ocorre principalmente devido ao transporte inadequado e com isso o estabelecimento do *rigor mortis* se dá na primeira hora pós-abate, mesmo antes de a carcaça ser levada a uma câmara fria. Isto ocorre porque a reserva energética não é suficiente, para sustentar os metabolismos anaeróbios *post mortem* muscular e microbiano, que produzem ácido láctico.

O pH também está intimamente ligado ao processo denominado maturação, que ocorre durante a estocagem refrigerada em embalagem a vácuo, consiste na proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas (ALVES, 2005) pela já citada formação de ácido lático, decorrente da degradação do glicogênio que provoca a queda do pH de 7,3 para aproximadamente 5,5 no espaço extracelular. Esse fato diminui a dissociação de eletrólitos fracos, aumenta a permeabilidade das membranas celulares, facilitando a difusão de enzimas citoplasmáticas, diminuindo a coesão das miofibrilas com ruptura de organelas intracelulares, principalmente os lisossomos e o retículo endoplasmático (PUGA *et. al.*, 1999). A consequência dessas modificações bioquímicas é a diminuição da coesão entre as miofibrilas e o aumento da maciez.

A maturação de cortes, embalados a vácuo, deve ocorrer em câmaras frigoríficas, com temperatura ambiente entre 2 e 0 °C, pelo período de 7 a 21 dias, pois Field *et al.* (1971) comprovaram que nestas condições e por este período não há alteração no *flavor*, o que está de acordo com o conceito de processamento mínimo.

Um alimento é considerado minimamente processado, desde que sejam usadas apenas técnicas que o preservem e também mantenham a sua qualidade nutricional, além das suas características sensoriais, reduzindo desta forma a dependência do calor como principal ação conservadora (Fellows, 2000). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, processamento mínimo significa manipular um produto sem alterá-lo fundamentalmente e sem adicionar ingredientes artificiais (USDA, 2015)

O processamento mínimo pode, portanto, ser visto no contexto da preocupação tradicional de processamento de alimentos para prolongar a vida de prateleira dos alimentos. Ao mesmo tempo, enquanto valorizam a conveniência que o aumento da vida útil pode trazer, os consumidores tornaram-se mais críticos com o uso de aditivos sintéticos para preservar alimentos ou melhorar características como cor e sabor (Bruhn, 2000) dentre outras.

Em embalagens com atmosfera modificada, normalmente são utilizadas misturas de oxigênio (O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e nitrogênio (N<sub>2</sub>). Cada gás desempenha um papel específico na extensão da vida útil da carne e na manutenção de sua aparência: CO<sub>2</sub>, inibição do crescimento de bactérias

aeróbicas deteriorantes e seleção de bactérias lácticas, O<sub>2</sub>, manutenção das características de cor da carne e N<sub>2</sub>, inertização (GILL, 1996; SØRHEIM *et al.*, 1999).

A limitada quantidade de oxigênio e a baixa temperatura de resfriamento, no empacotamento a vácuo de carne, geralmente o tornam muito estável, pois, inibe o crescimento bacteriano indesejável, haja vista que, nestas condições, as bactérias lácticas são, normalmente, as únicas a aumentarem sua população, chegando à ordem de 10<sup>7</sup> UFCs (Unidades Formadoras de Colônia).cm<sup>-2</sup> (GILL E NEWTON, 1978) e inibem o crescimento dos demais micro-organismos. Segundo Venturini (2009), o sistema de embalagem a vácuo, também denominado anóxico, comparado aos demais, é o que confere maior vida útil à carne mantida à temperatura em torno de 2 °C.

Apesar da embalagem a vácuo ser considerada eficiente na conservação de carne bovina resfriada, um grave problema, conhecido como *blown pack* ou tufamento de embalagem, pode ocorrer caso a contaminação microbiológica seja significativa ou não se respeite a temperatura mínima de resfriamento (4 ± 2 °C). De acordo com Jay (2005) a deterioração de carnes sob baixas temperaturas é seguida da produção de compostos sem coloração como amônia, H<sub>2</sub>S, indol e aminas. Entre os subprodutos metabólicos da deterioração da carne, as diaminas, cadaverina e putrecina são estudadas como indicadores da deterioração.

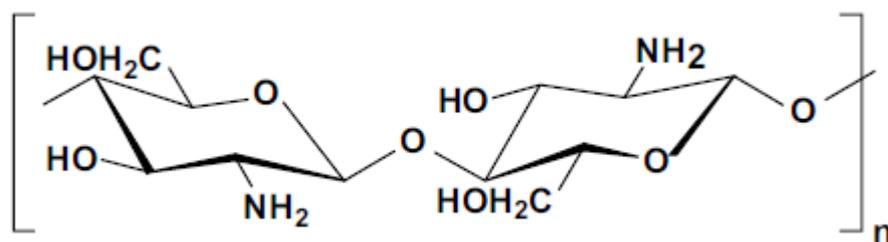
Uma avaliação de deterioração do tipo *blown pack*, de carnes embaladas a vácuo e refrigeradas, realizada por Brightwell *et al.* (2007), demonstrou números de moderados a elevados de enterobactérias na microbiota deteriorante dessas carnes. As análises, desenvolvidas por este autor, detectaram que as enterobactérias produziram gás em carne de cordeiro em condições de anaerobiose e que estes micro-organismos podem causar deterioração e tufamento da embalagem em carnes refrigeradas embaladas a vácuo. A produção de gás foi causada pela maioria das amostras de enterobactérias testadas incluindo espécies de *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia* e *Rahnella*. Algumas espécies de clostrídios, principalmente *Clostridium estertheticum* e *C. gasigenes*, também estão implicados como agentes causadores deste tipo de deterioração (BRIGHTWELL *et al.*, 2007).

É possível observar que além dos clostrídios, outros gêneros bacterianos, como bactérias ácido-lácticas e enterobactérias, por exemplo: *Lactobacillus* spp., principalmente o *L. sake* e o *L. curvatus*, *Leuconostoc gelidium*, *L. carnosum* e *L. mesenteroides* são frequentemente encontrados em carne *in natura* (BORCH *et al.*, 1996), sendo indicadas como responsáveis pela deterioração do tipo *blown pack*.

Portanto, a redução da proliferação microbiana em alimentos, por meio de revestimentos, que podem ser polímeros comestíveis, é necessária, pois esta medida garante o aumento do tempo de prateleira, a segurança alimentar, além da manutenção do aspecto do produto (GONZÁLES, 2008).

Um polímero natural, já utilizado na indústria alimentícia, é a quitosana, derivada do processo de desacetilação da quitina, que é tida como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades de beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose, conforme expressa na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização



Fonte: ASSIS E ALVES, 2002.

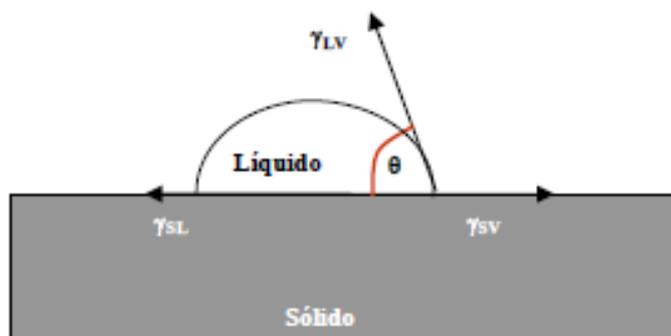
A quitosana tem também o potencial de ser aplicada para a proteção de alimentos, especialmente como filmes e revestimentos comestíveis (CASARIEGO *et al.*, 2008; CERQUEIRA *et al.*, 2009). As propriedades policatiônicas da quitosana fornecem a este polímero a possibilidade de formação de filmes, pela quebra dos segmentos poliméricos e subsequente reformação da cadeia de polímero em uma matriz, de película ou gel.

As formulações de revestimentos comestíveis deverão molhar e espalhar-se uniformemente na superfície do alimento. Após secagem, os revestimentos deverão ter uma adesão, coesão e durabilidade adequada (KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997).

As determinações das tensões superficial e superficial crítica de carne, significam caracterizar a superfície exposta da mesma. De acordo com Zisman (1964), em sistemas tendo tensão superficial menor que  $100 \text{ mN.m}^{-1}$  (superfícies de baixa energia), o ângulo de contato formado por uma gota de líquido, em uma superfície sólida, pode ser usado para cálculo da tensão superficial do líquido  $\gamma_L^V$  (onde a fase V é ar saturado com vapor do líquido, L), que permite a aplicação do método, desenvolvido por este autor, para determinar a capacidade molhante ou molhabilidade.

Uma das características primárias de um sistema bi ou trifásico, contendo duas fases condensadas, em que pelo menos uma delas é um líquido, é o ângulo de contato do líquido na outra fase condensada ( $\theta$ ). O ângulo de contato da gota de líquido, na superfície sólida, é definido pelo equilíbrio mecânico da gota sob a ação de três tensões interfaciais: sólido-vapor ( $\gamma_S^V$ ), sólido-líquido ( $\gamma_S^L$ ) e líquido-vapor ( $\gamma_L^V$ ), conforme pode ser observado na figura 2.

Figura 2 - Esquema representativo das tensões interfaciais existentes num sistema trifásico, em que duas das fases estão condensadas.



Fonte: Arquivo pessoal.

A capacidade molhante ou molhabilidade de um sólido por um líquido é determinada pelo balanço entre as forças adesivas (coeficiente de adesão,  $W_a$ , equação 1) do líquido no sólido e as forças coesivas (coeficiente de coesão,  $W_c$ ,

equação 2) do líquido. Enquanto que as forças adesivas fazem com que o líquido se espalhe sobre a superfície sólida, as forças coesivas fazem com que o fluido se contraia.

$$W_a = \gamma_L^V + \gamma_S^V - \gamma_S^L \quad (1)$$

$$W_c = 2 \cdot \gamma_L^V \quad (2)$$

Quando um sólido entra em contato com um líquido, na presença de vapor, o líquido irá aderir bem à superfície do sólido se a energia livre necessária para a criação de uma nova interface diminuir, isto é, o trabalho necessário para separar o sólido e o líquido da interface sólido-líquido tem que diminuir. O coeficiente de espalhamento ( $W_e$ ), equação 3, no equilíbrio é definido pela equação 1; para que o espalhamento ocorra espontaneamente, a energia livre do processo ( $\Delta G$ ) terá que ser inferior a zero.

$$W_e = W_a - W_c = \gamma_S^V - \gamma_L^V - \gamma_S^L \quad (3)$$

Para um líquido puro, se as interações polar ( $\gamma_L^p$ ) e dispersiva ( $\gamma_L^d$ ) são conhecidas, e se  $\theta$  é o ângulo de contato entre o líquido e o sólido, a interação pode ser descrita em termos de trabalho reversível de adesão,  $W_a$ , como:

$$W_a = W_a^d + W_a^p \Leftrightarrow W_a = 2 \cdot (\sqrt{\gamma_S^d} \cdot \sqrt{\gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p} \cdot \sqrt{\gamma_L^p}) \quad (4)$$

Onde  $\gamma_S^p$  e  $\gamma_S^d$  são as contribuições polar e dispersiva da superfície do sólido estudado. Rearranjando a equação 4 acima, temos:

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \cdot \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^p} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^d} \quad (5)$$

Além dos revestimentos comestíveis, a utilização de antibióticos naturais, para a conservação de alimentos, torna-se cada vez mais desejada, haja vista

que o consumidor moderno tende a exigir um alimento que preserve ao máximo as suas características originais e isento de produtos sintéticos, para que se atinja este objetivo (Vaithyanathan *et al.*, 2011; Economou *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2009; Chouliara *et al.*, 2007).

Um produto com tais características é a própolis, uma substância natural e resinosa, coletada em botões florais de diferentes espécies de árvores por abelhas, para a assepsia de suas colmeias, conhecida milenarmente por suas propriedades antimicrobiana e antioxidante (Koo, 2000).

A própolis ganhou popularidade para utilização na medicina alternativa ou como alimento para a saúde e prevenção de doenças em várias partes do mundo, incluindo os Estados Unidos, a União Europeia e o Japão (Teixeira, *et al.*, 2005). A própolis verde, também conhecida como a própolis brasileira, é derivada principalmente ou exclusivamente de plantas de alecrim (*Baccharis dracunculifolia*) (Teixeira *et al.*, 2005).

Em termos de composição, é geralmente constituída por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias. Dentre estas se incluem minerais e compostos orgânicos como ácidos fenólicos aromáticos (por exemplo: ácido cinâmico e ácido caféico) ou seus ésteres, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonóis e di-hidroflavonóis chalconas), terpenos, aldeídos, álcoois aromáticos, ácidos graxos, estilbenos e  $\beta$ -esteroides (Lima *et al.*, 2009; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Flavonóide pertence a um dos principais grupos de compostos ativos na própolis, portanto, o conteúdo de flavonóides é frequentemente utilizado para avaliar a qualidade da mesma (Brasil, 2001; Lima *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2012).

Com o advento da nanotecnologia, possibilitou-se a utilização de quantidades reduzidas de um determinado produto, obtendo-se resultados mais satisfatórios, em virtude do aumento da superfície de contato da partícula (aumento da relação superfície/volume). Sendo assim, uma forma de potencializar a atuação da própolis é reduzi-la à forma de nanopartículas.

A venda de carne previamente embalada, em um sistema que prolongue ao máximo a sua vida útil, preservando o seu aspecto natural, principal fator que determina a decisão de compra pelo consumidor, pode ser muito vantajosa

(SARAIVA, 2008), o que não ocorre com carne congelada, cuja aceitação é menor.

Sendo assim, o intuito do presente trabalho foi desenvolver uma solução filmogênica a base de quitosana, visando estender a conservação de carne *in natura* e portanto o seu tempo de prateleira, mantendo as suas principais características sensoriais e com foco na segurança alimentar.

## 2. OBJETIVOS

- Determinar a melhor formulação e propriedades de solução filmogênica de quitosana, a ser utilizada em carne;
- Determinar semanalmente algumas variações físicas, químicas e microbiológicas de amostras de carne;
- Sintetizar e caracterizar extrato etanólico (EEP) e nanopartículas de própolis (NPs);
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC), do EEP e das NPs às bactérias, pertencentes a gêneros comumente encontrados em carne:

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Determinação da tensão superficial da carne

Carne bovina, proveniente do músculo *longissimus dorsi*, foi cortada em pequenas tiras, com as mesmas dimensões (1 X 5 cm no sentido das fibras musculares). Essas tiras foram colocadas, uma de cada vez, sobre placas de vidro e acopladas à base de um equipamento para medição de ângulos de contato (OCA 20, Dataphysics, Alemanha), conectado a um computador que contém um *software* específico, para controle e aquisição de dados. Ao mesmo equipamento, foi acoplada uma seringa de vidro, com capacidade para até 500  $\mu\text{L}$  da solução desejada. Para cada líquido, foram feitas 15 repetições em 5 amostras de carne, sendo que cada gota tinha 2,0  $\mu\text{L}$ .

As determinações dos ângulos de contato, das gotas de três compostos líquidos (L) puros: bromonaftaleno (Merck, Alemanha), formamida (Merck, Alemanha) e água ultrapura, na superfície da carne, combinadas com os valores da tensão dos líquidos puros utilizados, permitiram o cálculo da tensão superficial da carne.

#### 3.2 Determinação de tensões superficiais de soluções filmogênicas de quitosana

De acordo com dados obtidos na literatura, foram escolhidas duas concentrações de quitosana (1 e 2% m/V), duas do tensoativo tween 80 (0,0 e 0,2% m/V) e duas do agente plastificante glicerol (0,5 e 1,5% m/V). Através de um planejamento fatorial com ponto central, foram preparadas e testadas 9 diferentes formulações, com diferentes concentrações de quitosana (1,0, 1,5 e 2% m/V), tween 80 (0,0, 0,1 e 0,2% m/V) e glicerol (0,5, 1,0 e 1,5% m/V), conforme pode ser observado na tabela 1. Todas elas foram solubilizadas em ácido láctico diluído a 1% (V/V), com auxílio de um agitador magnético, durante 12h.

Tabela - 1 Formulações das soluções filmogênicas de quitosana

Substância	Concentrações utilizadas (%)									
	Glicerol	0,50		0,50		1,00		1,50		1,50
Tween 80	0,00		0,20		0,10		0,20		0,00	
Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00	

As tensões superficiais das soluções filmogênicas, foram medidas com auxílio de um tensiômetro mecânico (Krüss, Alemanha). Os valores de tensões superficiais foram obtidos, através da inserção e retirada, na solução desejada, de um aro metálico específico, acoplado ao equipamento obtendo-se o valor em  $\text{mN.m}^{-1}$ .

### 3.3 Estudo das soluções filmogênicas de quitosana

Foram testadas as 9 mesmas formulações, do experimento anterior de caracterização, (quitosana a 1,0, 1,5 e 2% m/V, tween 80 a 0,0, 0,1 e 0,2% m/V e glicerol a 0,5, 1,0 e 1,5% m/V, solubilizados em ácido láctico diluído a 1% V/V).

A carne bovina, proveniente do músculo *Longissimus dorsi*, foi novamente cortada em pequenas tiras, com as mesmas dimensões (1 x 5 cm), no sentido das fibras musculares. As tiras foram colocadas, uma de cada vez, sobre placas de vidro e acopladas à base de um equipamento para medição de ângulos de contato (OCA 20, Dataphysics, Germany), conectado a um computador que contém um *software* específico, para controle e aquisição de dados. A este mesmo equipamento, foi acoplada uma seringa de vidro, com capacidade para até 500  $\mu\text{L}$  da solução desejada. Para cada formulação foram feitas 15 repetições em 5 amostras de carne, sendo que cada gota tinha 2,0  $\mu\text{L}$ .

Desta forma, foram realizadas as determinações dos ângulos de contato, de cada gota e então foram calculadas as médias das 15 repetições de cada formulação. Após a obtenção das tensões superficiais, de todas formulações dos filmes, foi possível calcular os coeficientes de adesão ( $W_a$  – equação 1, página 24), coesão ( $W_c$  – equação 2 – página 24) e de espalhamento ( $W_e$  – equação 3,

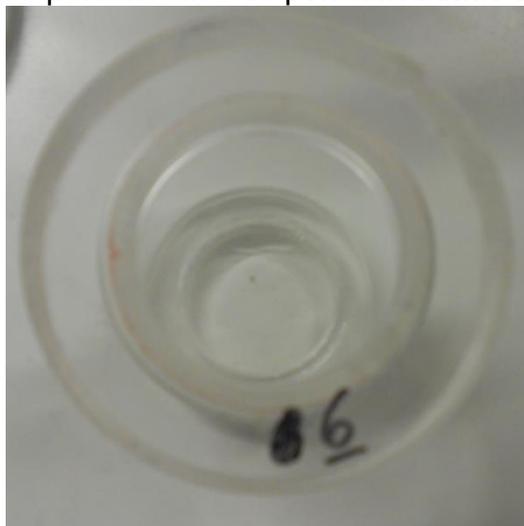
página 24), este último foi o que determinou qual(is) formulação(ões) foi (foram) a(s) mais adequada(s).

### **3.4 Determinação de permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água**

Este experimento foi baseado no método ASTM-D- 3985-02 (2002 – em anexo). Primeiramente, a solução do filme foi preparada, de acordo com a melhor formulação determinada no experimento anterior. Em seguida, foram depositados 28 mL desta solução, em placas de Petri descartáveis de 90 mm, e deixados secar durante 12h, em estufa com circulação de ar a 30 °C, em um total de 6 réplicas.

Para a medição da permeabilidade ao vapor d'água foram usados 6 frascos de acrílico, contendo 50 mL de água destilada e uma tampa com abertura (figura 3), que permitiu prender o filme, deixando-o exposto ao ar e ao vapor d'água.

Figura 3 – Frasco para ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.



Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida, estes frascos foram colocados em um dessecador, contendo sílica desidratada e ventoinhas para facilitar as trocas gasosas (figura 4).

Figura 4 – Dessecador com ventoinhas para circulação de ar durante a realização de ensaios de permeabilidade ao vapor d'água.



Fonte: Arquivo pessoal.

Estes frascos foram pesados, já contendo a água e os filmes, depois foram colocados no dessecador. Após intervalos de 2h foram pesados novamente, para avaliação da perda d'água e consequente permeabilidade, até um total de 10h de monitoramento quando, pelo método citado e em anexo, é sabido que já ocorre uma estabilização na perda d'água.

### **3.5 Determinação de permeabilidade do filme selecionado aos gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>**

A permeabilidade ao oxigênio (PO<sub>2</sub>) e a permeabilidade dióxido de carbono (PCO<sub>2</sub>) foram determinadas com base no método ASTM D-3985-02 (2002 – em anexo). Os filmes foram selados entre duas câmaras, tendo cada uma dois canais, conforme pode ser observado na figura 5.

Figura 5 – Câmara para determinação de permeabilidade gasosa em filmes.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na câmara inferior,  $O_2$  (ou  $CO_2$ ) foi fornecido a um fluxo contínuo, por meio de um controlador de fluxo gasoso (Agilent Technologies - ADM 2000, EUA), para manter a pressão constante naquele compartimento. À câmara superior, foi conectada uma fonte de  $N_2$  gasoso, também com fluxo controlado. O  $N_2$  agiu como um carreador para o  $O_2$  (ou o  $CO_2$ ). Para a medição da  $PO_2$  ou ( $PCO_2$ ), amostras do fluxo de saída foram coletadas em uma seringa para a quantificação destes gases.

Aos canais de saída, das duas câmaras, foram conectados manômetros, para garantir a igualdade das pressões (ambas a 1 atm) entre os dois compartimentos. À medida que o  $O_2$  (ou o  $CO_2$ ) foi carreado de forma contínua pelo fluxo de nitrogênio, foi considerado que a pressão parcial de  $O_2$  (ou  $CO_2$ ) no compartimento superior era nula. Por conseguinte, a pressão diferencial ( $\Delta P$ ) era igual a 1 atm. Foram testadas três réplicas do filme e obtidas três amostras para cada filme, em cada caso ( $PO_2$  e  $PCO_2$ ).

Para determinar a concentração de  $O_2$ , 1 mL de amostra foi injetada em um cromatógrafo de fase gasosa (Chrompack 9001, Middelburg, Holanda) equipado com uma coluna Porapak Q 80/100 mesh mx 2 1/8 "x 2 mm SS, uma coluna do tipo peneira molecular e um detector de condutividade térmica TCD. Para o  $CO_2$ , foi feito o mesmo procedimento, exceto pelo desvio da amostra, através de uma

válvula, diretamente para a coluna Porapak, sem passar pela peneira molecular. Em ambos os casos, uma mistura padrão, contendo 10% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> e 70% de N<sub>2</sub> foi usada para calibração.

### **3.6 Determinação da espessura e das propriedades mecânicas de um filme de quitosana**

Os filmes foram preparados conforme descrito anteriormente, no item 3.2, da página 22. Para determinação da espessura média, foram preparados 3 filmes e cada um destes foram medidos em quatro pontos distintos, com auxílio de um micrômetro digital (Modelo 293-561, Mitutoyo, Japão). Para se determinar o alongamento máximo e a tensão necessária para romper o filme de quitosana, foram utilizadas três tiras de 2 x 5cm de três filmes distintos. Estas tiras foram acopladas a um equipamento Instron Universal Testing Machine (Modelo 4500, Instron Corporation) e os testes foram realizados seguindo as diretrizes da norma ASTM D 882-91 (em anexo).

### **3.7 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado**

O teor de umidade e a solubilidade do filme selecionado foi determinado seguindo metodologia descrita por Gontard *et al.* (1994). Cadinhos foram limpos e deixados em estufa a 105 °C, 24h antes deste experimento. Após preparar o filme (triplicata), conforme descrição anterior, ele foi cortado em discos (triplicata) com 2 cm de diâmetro, que em seguida foram pesados e colocados em estufa a 105 °C, dentro dos cadinhos, previamente pesados e identificados. Após 24 h, os cadinhos contendo os filmes foram pesados novamente para determinação do teor de umidade e colocados de volta na estufa.

Para determinação da solubilidade, os mesmos filmes cortados em discos e secos foram colocados em béqueres identificados, com 50 mL de água destilada, barras magnéticas e selados em cima com Parafilm®. Em seguida, foram

deixados em agitação durante 24 h, depois filtrados em membranas de nylon, com diâmetro de poro de 100  $\mu\text{m}$ . Por último, o filtrado de cada disco de filme foi colocado no respectivo cadinho e seco a 105 °C, novamente, durante mais 24 h e por fim pesados mais uma vez.

### **3.8 Caracterização de superfície, do filme selecionado por microscopia de força atômica (MFA)**

Foram depositados 28 mL de solução do filme selecionado, em placas de Petri descartáveis de 90 mm. Após secagem, durante 12h em estufa a 30 °C, as imagens por MFA foram obtidas mantendo as amostras nas próprias placas de Petri, utilizando-se um equipamento da marca Veeco, modelo Dimension V.

### **3.9 Determinação de pH de amostras de carne**

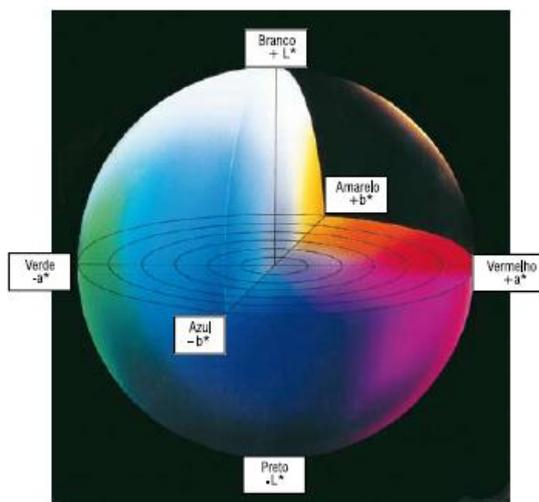
Durante o período de análises (21 dias), foi feito acompanhamento semanal do pH de amostras de *L. dorsii* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR) revestimento, embaladas a vácuo (VA) ou não (NV) em PVC, sob refrigeração a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$ . O revestimento foi aplicado por meio de aspersão da solução, determinada como sendo a de melhor formulação, sobre as amostras de carne. Para os dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), pois sabidamente já estariam deterioradas, ou seja, em adiantado estágio de putrefação. Para este experimento, foi utilizada a metodologia descrita por Murphy *et al.* (2013). Amostras de carne (10 g) foram trituradas e posteriormente homogeneizadas (1 minuto, 24.000 rpm) em 90 mL de água ultra pura com o uso de Ultra Turrax. Em seguida foi feita a medida do pH em pH-metro de bancada.

### 3.10 Avaliação colorimétrica de amostras de carne

Durante o período de análises (21 dias), foi feito acompanhamento semanal da colorimetria de amostras de *L. dorsi* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR) revestimento, embaladas ou não a vácuo em PVC a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$ , também com exceção nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), Utilizou-se um colorímetro Chroma Meter CR- 400/410 (Konica Minolta©) no conceito CIELAB e o espaço  $L^*a^*b^*$ .

O parâmetro “a\*” indica a cromaticidade em um eixo verde (-) para o vermelho (+). O parâmetro “b\*” indica a cromaticidade em um eixo azul (-) para o amarelo (+). O ângulo de Hue é um ângulo em uma circunferência de cor de  $360^\circ$ , em que os ângulos  $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$ , e  $270^\circ$  representam respectivamente as cores: vermelha, amarela, verde e azul, conforme representado na figura 6, abaixo. O croma é a intensidade de Hue.

Figura 6 - Representações do sólido das cores pelo método CIE  $L^*a^*b^*$  no espaço das cores.



Fonte: Konica Minolta Sensing Americas.

Foram feitas três medidas de colorimetria sobre as embalagens em três pontos diferentes da carne, escolhidos aleatoriamente. A partir dos valores de

a\*b\* foi possível obter os valores de croma e hue, por meio das equações 6 e 7 a seguir.

$$\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (6)$$

$$\text{Hue} = \tan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (7)$$

### 3.11 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA)

Durante o período de análises (21 dias), foi feito acompanhamento semanal da CRA de amostras de *L. dorsis* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR) revestimento, embaladas (VA) ou não (NV) a vácuo em PVC a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$  exceto nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), pois sabidamente já estariam deterioradas ou seja, em adiantado estágio de putrefação. Pesaram-se pequenas porções (triplicata) de amostras, em pedaços únicos, com massa entre 2,00 a 2,10 g. Em seguida, estas amostras foram colocadas em envelopes de papel filtro qualitativo (100 x 200 mm) e prensadas, durante 5 minutos entre duas placas de acrílico (150 x 150 x 5 mm) com um cilindro de aço de alta densidade, cuja massa é de 10,00 kg. Por fim, as amostras foram pesadas novamente e o cálculo da CRA era feito de acordo com a equação 8.

$$\text{CRA}\% = \frac{\text{Massa não prensada} - \text{Massa prensada}}{\text{Massa não prensada}} \times 100 \quad (8)$$

O resultado foi expresso como uma porcentagem do peso inicial.

### 3.12 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS)

Oxidação lipídica foi medida nos dias 0, 7, 14 e 21, de armazenamento de amostras de *L. dorsi* (2,5 cm de espessura) com (RE) e sem (NR) revestimento, embaladas (VA) ou não (NV) a vácuo em PVC a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$  exceto nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas (NVNR), pois já estariam deterioradas. Foi utilizado o ensaio de ácido 2-tiobarbitúrico como descrito por Siu e Draper (1978). Amostras de carne trituradas (5 g) foram homogeneizadas, durante 2 min em 25 mL de água destilada, usando um dispersador Ultra-Turrax® (IKA® Works, Inc. - Alemanha). Em seguida, foram adicionados 25 mL de Ácido tricloroacético (TCA – Labsynth, Brasil) a 10% e a mistura foi agitada vigorosamente e filtrada através de papel de filtro Whatman nº 1. Em um tubo de ensaio com tampa de rosca, 4 mL de filtrado límpido foram adicionados a 1 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA – Alfa Aesar®, EUA) a 0,06 M. Os tubos, então, foram colocados em água, mantida a  $80^\circ\text{C}$ , durante 90 min. A absorbância de 5 mL do filtrado, contendo TCA e TBA, foi medida por espectrofotometria (Cary 300 Bio, UV-Vis, Varian Instruments, EUA) a 532 nm e comparado a um “branco”, contendo todos os reagentes (2 mL de água destilada, 2 mL de TCA a 10% e 1 mL de 0,06 M de TBA). O teor de malondialdeído (MDA) das amostras foi calculado, usando um coeficiente de extinção de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em mg de MDA/kg de carne (laudo em anexo).

### 3.13 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-lácticas (BALs) e psicotróficas totais em amostras de carne

Para esta avaliação, que também foi semanal, foram preparadas placas de Petri contendo três tipos de meios de cultura, com ágar (sólidos) MacConkey (AMC), DeMan, Rogosa e Sharpe (AMRS) e Sangue Base (ASB). Entretanto, foi utilizada a técnica *pour-plate*, na qual se injeta o inóculo com o meio ainda morno,

em torno de 40 °C, antes da solidificação. O inóculo foi semanalmente obtido, com uso de exsudato da carne, embalada nas diferentes condições mencionadas (amostras de *L. dorsi* com 2,5 cm de espessura, com - RE - e sem - NR- revestimento, embaladas – VA - ou não - NV - a vácuo em PVC a  $0 \pm 1^\circ\text{C}$ , exceto nos dias 14 e 21 que não foram preparadas amostras sem vácuo e não revestidas - NVNR, pois já estariam deterioradas). As embalagens foram abertas assepticamente, dentro de uma câmara de fluxo laminar e então, com auxílio de uma pipeta automática e ponteiros esterilizados, foi retirado 1 mL de exsudato de cada amostra. Em seguida, foram feitas diluições seriadas deste inóculo, sempre da ordem de  $10^{-1}$ , em solução salina (0,9%) peptonada (0,1%). Por fim as diluições foram inoculadas nos diferentes meios e incubadas a 37 °C por 24h (AMC), para o crescimento de enterobactérias totais, 30 °C por 72h (AMRS) em jarras com gerador de anaerobiose (Anaerocult® Merck – Alemanha), para o crescimento de BALs totais e a 6 °C por 168h (ASB) para o crescimento de psicotróficas totais. Por fim, em geral, foram consideradas as contagens entre 25 e 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC. mL<sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de Colônias).

### **3.14 Síntese e caracterização de extrato e nanopartículas de própolis**

#### **3.14.1 Características da própolis**

Própolis verde foi obtida no sul do estado de Minas Gerais e a florada predominante foi de alecrim. Extrato etanólico de própolis (EEP) foi preparado, mediante a maceração de 12,75 g de própolis verde, em almofariz de ágata. Posteriormente, a própolis macerada foi colocada em um béquer de 250 mL, junto a 100 mL de álcool etílico absoluto, com uma barra magnética e coberto com Parafilm®. Na sequência, este béquer foi colocado em agitador magnético, a 600 rpm durante 360 h.

Para análise de fenóis totais solúveis, o procedimento de Swain e Hillis (1959) foi adaptado com poucas modificação. Três réplicas foram utilizadas para as

análises. Uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  de EEP a 0,125% (w/V) foi diluída com 2400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, seguido pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de Folin-Ciocalteu a 0,25 N. Na sequência, esta mistura foi incubada durante 3 minutos no escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1 N e a mistura foi incubada novamente no escuro durante 25 min. As absorbâncias das amostras a 725 nm foram feitas usando espectrofotômetro da marca SHIMADZU (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, EUA), modelo UV-1600. Uma amostra preparada com metanol foi utilizada como controle. O teor total de compostos fenólicos foi determinado para cada amostra, utilizando uma curva padrão (0-0,375  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) desenvolvida com ácido gálico e expressa como mg de ácido gálico por g de extrato etanólico.

Para determinação do teor de flavonoides totais no EEP, foi utilizado o método descrito por Funari e Ferro (2006). Uma alíquota do extrato (1 mL) a uma concentração de 0,25% (m/V) de própolis, foi misturada com 1 mL de solução etanólica de  $\text{AlCl}_3$  a 2% (m/V) e o volume foi completado até 25 mL com etanol absoluto. Após 30 minutos à temperatura ambiente e sem exposição à luz, a absorbância foi medida a 425 nm utilizando o mesmo espectrofotômetro de UV descrito experimento anterior (SHIMADZU -1600). O branco foi obtido com 1 mL de solução etanólica de  $\text{AlCl}_3$  a 2% (m/V) e mais 24 mL de etanol absoluto. O teor de flavonoides totais foi calculado em equivalentes de quercetina ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a partir de uma curva de calibração (concentração de 2 a 12  $\mu\text{g}$  de quercetina. $\text{mL}^{-1}$ ). Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como mg de quercetina por g de extrato etanólico.

Para determinação da capacidade antioxidante de compostos fenólicos, o método usado foi desenvolvido por Brand-Williams *et al.* (1995) e modificado por Sanchez-Moreno *et al.* (1998). Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de EEP foi misturada com 3900  $\mu\text{L}$  de 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH a 0,06M em metanol) e incubada no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram deixadas em reação durante 15 minutos, até que as condições de estado estacionário fossem alcançadas. O metanol foi utilizado como branco e medições de absorbância foram feitas a 515 nm. A capacidade antioxidante foi calculada medindo a diminuição da absorbância das amostras, em comparação com o controle (3900

$\mu\text{L}$  de DPPH com 100  $\mu\text{L}$  de metanol). Uma curva dose-resposta foi representada graficamente para determinar o valor de CE50. CE50 é definida como a concentração necessária para obter 50% da capacidade máxima de oxidação. Todos os testes e análises foram realizadas em triplicata. O padrão usado no ensaio foi o Trolox (Sigma, EUA).

Para identificar alguns dos principais compostos fenólicos, foi realizada cromatografia analítica do EEP bruto, utilizando uma coluna C18 RP Agilent (2,5 X 25 mm X 5  $\mu\text{m}$ ), por comparação com padrões analíticos. A fase móvel foi constituída por ácido acético / acetato de amônia / metanol / água (0,8 : 0,3 : 5,0 : 93,9% V / m / V / V) (solvente A) e acetonitrila (solvente B), definidos inicialmente na proporção de 75 : 25% (V / V), que foi linearmente mudado para 0 : 100% (V / V) durante 60 min de corrida. O eluente foi bombeado a um fluxo de 1 mL / min. Veratraldeído (Tr = 11,80 min) foi utilizado como padrão interno (IS), e foi adicionado ao solvente de extração, antes da extração. Os dados espectrais do detector de UV foram coletados após os 60 min a 280 nm. Os picos foram atribuídos de acordo com seus tempos de retenção e por coeluição com padrões analíticos, bem como baseado em espectros de UV para os padrões e amostras, sob as mesmas condições cromatográficas.

Todas as soluções padrões de ácido caféico, crisina, ácido ferúlico, campferol, ácido p-cumárico, quercetina e sakuranetina foram preparadas a 100 ppm.

### **3.14.2 Síntese e caracterização de nanopartículas de própolis**

Cinco mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) a 0,1%, foram filtrados em membrana de *nylon* com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Em seguida, esta solução foi aquecida a 35 °C e agitada a 600 rpm, em chapa aquecedora com agitação magnética. Posteriormente, foi adicionado por gotejamento 1 mL de EEP, preparado conforme descrição do item 3.14.1 e também filtrado no mesmo tipo de membrana, com auxílio de uma bomba de seringa, ao fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, obtendo-se as nanopartículas de própolis.

O diâmetro médio de nanopartículas de própolis, em suspensão, foi determinado pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) utilizando-se um equipamento Zetasizer Nano® da marca Malvern e por Microscopia de Força Atômica (MFA), utilizando-se um equipamento da marca Veeco, modelo Dimension V. Para o primeiro método, foi preenchida uma cubeta, específica ao equipamento, com a suspensão de nanopartículas. Posteriormente, para o segundo método, foram depositados trinta microlitros da mesma suspensão de nanopartículas, em lâmina de mica. Após secagem durante 12h em dessecador, contendo sílica desidratada, o tamanho das partículas foi obtido, por MFA.

### **3.15 Determinação da MIC de extrato e nanopartículas de própolis**

A concentração inibitória mínima (MIC na sigla em inglês) qualitativa foi determinada para 8 espécies de bactérias, pertencentes a gêneros comumente presentes em amostras de carne, em especial, de carne embalada a vácuo. Sendo elas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thompson*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter helveticus*, *Lactobacillus bucheneri* and *Leuconostoc mesenteroides*. O método utilizado foi a difusão em ágar e medição de halos inibitórios. Como o extrato era etanólico, foi feito um controle negativo (branco) somente com este solvente e no caso dos bioensaios com as NPs, também foi feito um controle somente com PVA a 0,1%.

### **3.16 Análises estatísticas**

Para avaliar os efeitos dos reagentes no We dos filmes, foi realizado um ajuste por regressão e Análise de Variância - ANOVA. Para avaliar o efeito das diferentes condições de armazenagem sobre pH, colorimetria, CRA, oxidação lipídica e microbiologia, foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Os softwares utilizados para a realização das análises foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da superfície da carne

A tensão superficial da carne em relação à água ultrapura foi  $15,65 \text{ mN.m}^{-1}$ , em relação à formamida,  $10,78 \text{ mN.m}^{-1}$  e em relação ao bromonaftaleno,  $6,58 \text{ mN.m}^{-1}$ . Conclui-se, portanto, que se trata de uma superfície de baixa energia.

### 4.2 Determinação da tensão superficial das soluções de filmes e da melhor formulação do filme de quitosana

Após a obtenção das tensões superficiais e dos ângulos de contato, de todas as formulações dos filmes, conforme podem ser vistas as médias nas tabelas 1 e 2, foi possível calcular os coeficientes de adesão ( $W_a$  – equações 1,4 e 5, páginas 24 e 25), coesão ( $W_c$  – equação 2 – página 24) e de espalhamento ( $W_e$  – equação 3, página 2), sendo este último o que determinou se qual(is) formulação(ões) é (são) a(s) mais adequada(s) (tabela 6).

Tabela - 2 Médias das tensões superficiais das soluções filmogênicas de quitosana

TENSÃO SUPERFICIAL ( $\text{mN.m}^{-1}$ )									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
<b>Médias</b>	<b>59,23</b>	<b>45,16</b>	<b>39,87</b>	<b>43,00</b>	<b>42,37</b>	<b>40,40</b>	<b>42,20</b>	<b>55,17</b>	<b>62,03</b>

Tabela 3 - Médias dos ângulos de contato das soluções filmogênicas de quitosana

ÂNGULOS CONTATO (GRAUS)									
% Glicerol	0,5		0,5		1	1,5		1,5	
% Tween 80	0		0,2		0,1	0,2		0	
% Quitosano	1	2	1	2	1,5	1	2	1	2
<b>Médias</b>	<b>27,67</b>	<b>50,83</b>	<b>37,16</b>	<b>47,14</b>	<b>56,28</b>	<b>36,66</b>	<b>50,41</b>	<b>30,46</b>	<b>52,55</b>
Radianos	0,482874	0,887093	0,648564	0,822748	0,982271	0,639838	0,879879	0,531627	0,917112

Os resultados  $\leq 0$  indicam equilíbrio entre adesão e coesão. Se a adesão for maior que a coesão o filme não se mantém íntegro. De acordo com os resultados

apresentados na tabela 4, as duas melhores formulações foram: quitosana a 1%, tween 80 0% e glicerol a 0,5 ou 1,5%, com  $W_e$  de -6,77 e -7,61, respectivamente.

Tabela - 4 Médias dos coeficientes de adesão de cada formulação de solução filmogênica de quitosana

<b><math>W_a</math></b>									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
	111,69	73,69	71,74	71,09	65,97	72,81	69,09	102,72	99,76

Tabela - 5 Médias dos coeficientes de coesão de cada formulação de de solução filmogênica de quitosana

<b><math>W_c</math></b>									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
	118,47	90,33	79,73	86,00	84,73	80,80	84,40	110,33	124,07

Tabela - 6 Médias dos coeficientes de espalhamento de cada formulação de de solução filmogênica de quitosana

<b><math>W_e</math></b>									
% Glicerol	0,50		0,50		1,00	1,50		1,50	
% Tween 80	0,00		0,20		0,10	0,20		0,00	
% Quitosana	1,00	2,00	1,00	2,00	1,50	1,00	2,00	1,00	2,00
	-6,77	-16,64	-7,99	-14,91	-18,76	-7,99	-15,31	-7,61	-24,31

Para avaliar os efeitos dos reagentes no  $W_e$  dos filmes, foi realizado um ajuste por regressão e Análise de Variância - ANOVA. O nível de significância adotado para estas análises foi de 5%.

Conforme pode ser visto na tabela 7 e no gráfico 1, as únicas variáveis significativas, ao nível de significância de 5%, são a quitosana e a interação entre ela e o tween 80. Entretanto, como o tween sozinho não passou no teste, podemos desconsiderar que essa interação seja importante. No gráfico 2, podemos observar que o ponto com menor variação é o que corresponde a

formulação de quitosana a 1%, tween 80 0% e glicerol a 0,5%, sendo este um dos critérios para escolha desta formulação, como a mais adequada, para aplicação em carne.

Tabela - 7 Resultados da ANOVA para avaliação dos efeitos dos reagentes no We das soluções filmogênicas de quitosana

Fator	p
(1) % Glicerol L	0.108
(2) % Tween 80 L	0.052
(3) % Quitosana L	0.000
1*2	0.257
1*3	0.204
2*3	0.018

Gráfico 1 – Gráfico de Pareto indicando influência positiva para as variáveis ou interações delas cujas barras ultrapassam a linha vermelha tracejada

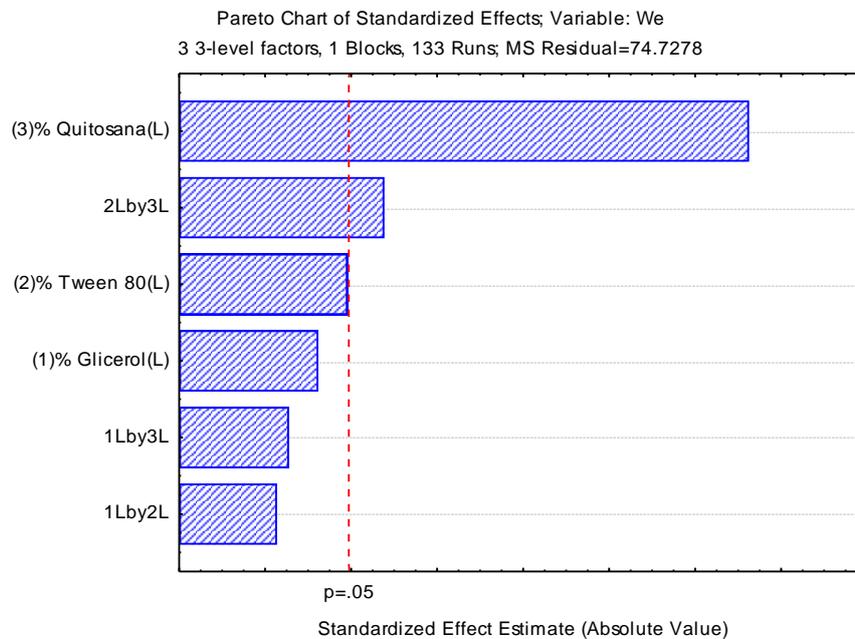
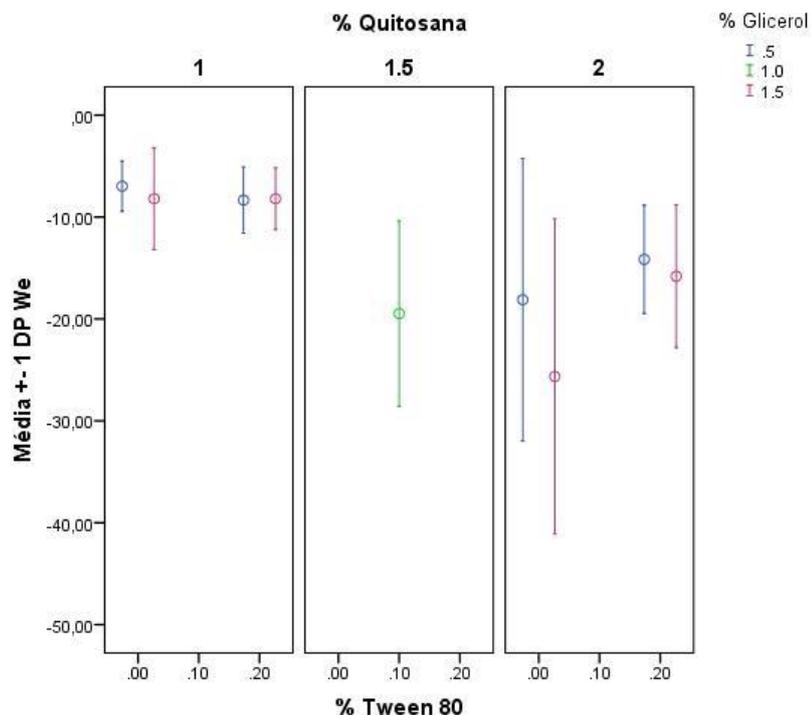


Gráfico 2 - Médias e desvios-padrão do We



### 4.3 Determinação da permeabilidade de um filme de quitosana ao vapor d'água

O valor obtido para a permeabilidade ao vapor d'água do filme selecionado foi de  $5,16 \pm 0,83 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$ . Este valor está na mesma escala de grandeza obtida por Pellissari *et al.* (2009), que foi de  $1,39 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$  e próximo ao obtido por Bonilla *et al.* (2012), que obteve valores entre  $3,30$  e  $8,96 \cdot 10^{-10} \text{ g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$ , também para filmes a base de quitosana. Estas diferenças se devem às distintas formulações dos filmes estudados.

A permeabilidade ao vapor d'água é um dos fatores mais importantes com relação às propriedades do filme, em especial no caso de revestimento para carne, um alimento rico em água, pois ela determina se o filme irá ajudar a manter a suculência do produto e evitar o acúmulo de água livre, rica em nutrientes, que favorece a proliferação microbiana.

#### **4.4 Determinação de permeabilidade do filme selecionado aos gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>**

Os valores obtidos para as permeabilidades aos gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, respectivamente foram de  $1,53 \pm 0,73 \cdot 10^{-15} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  e de  $1,20 \pm 0,06 \cdot 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$ . Fajardo *et al.* (2010), em um filme à base de quitosana elaborado para queijo, obteve os valores de  $7,12 \cdot 10^{-15} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  para O<sub>2</sub> e  $1,07 \cdot 10^{-13} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  para CO<sub>2</sub>. Já Bourbon *et al.* (2011), em um filme comestível de quitosana sem aplicação definida, obteve os valores de  $5,17 \cdot 10^{-14} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  para O<sub>2</sub> e de  $5,86 \cdot 10^{-13} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$  para CO<sub>2</sub>. Tendo em vista que o filme utilizado foi elaborado para carne, é importante que a propriedade de barreira gasosa seja maior para o O<sub>2</sub> e menor para o CO<sub>2</sub>, pois a retenção de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub> são importantes na manutenção da cor vermelha (oximioglobina), desejável na carne.

#### **4.5 Determinação de espessura e de propriedades mecânicas de um filme de quitosana**

A espessura média dos filmes foi de  $87 \pm 11 \mu\text{m}$ . A média da elongação máxima até a ruptura foi de  $37,2 \pm 2,7 \text{ mm}$  e da tensão máxima para ruptura foi  $3,7 \pm 0,9 \text{ MPa}$ .

A espessura média deste filme, foi praticamente a metade da obtida por Bourbon *et al.* (2011), para um filme de quitosana também, de  $174 \pm 9 \mu\text{m}$ . Mesmo assim, o alongamento de  $74,46 \pm 5,47\%$  foi praticamente igual ao obtido por estes autores ( $69,84 \pm 4,08\%$ ), embora a tensão máxima para ruptura obtida por eles tenha sido em média mais de 3 X superior ( $11,58 \pm 1,20 \text{ MPa}$ ). Isso demonstra que, embora o filme obtido, neste trabalho, seja menos espesso e frágil, a sua flexibilidade é muito maior, podendo talvez ser o dobro.

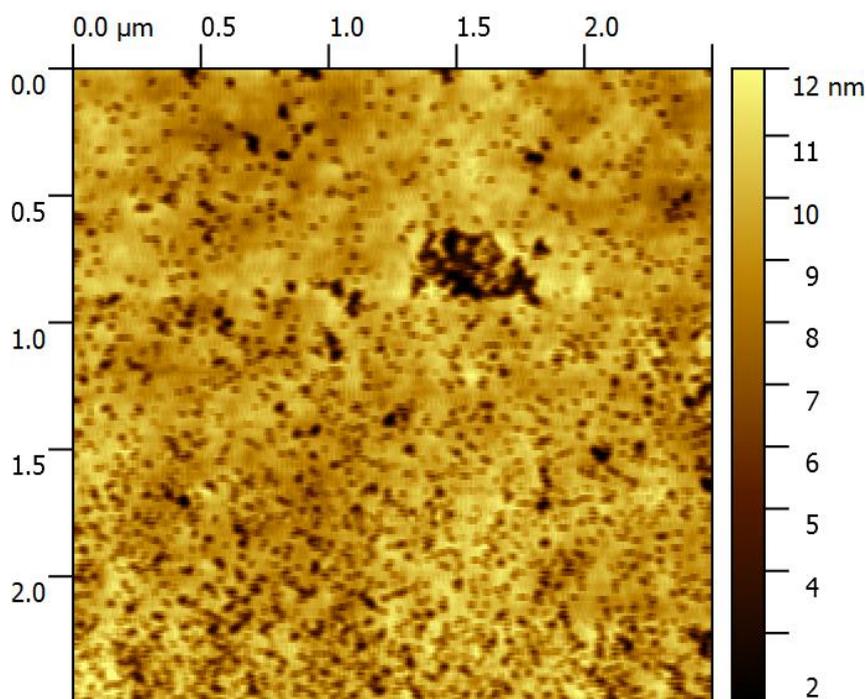
#### 4.6 Avaliação de teor de umidade e solubilidade do filme selecionado

O teor de umidade e a solubilidade obtidos para o filme escolhido foram, respectivamente de  $59,1 \pm 1,2\%$  e  $26,6 \pm 2,8\%$ . Fundo *et al.* (2015) obteve em média, para filmes de quitosana a 1%, teor de umidade de  $38,8 \pm 3,8\%$  e solubilidade de 56,84%. Como o filme sintetizado foi desenvolvido para uso em carne *in natura*, um alimento com elevado teor de umidade e atividade de água, a alta solubilidade não é interessante, pois o filme não manteria sua integridade e perderia suas propriedades de barreira.

#### 4.7 Caracterização de superfície, do filme selecionado por microscopia de força atômica (MFA)

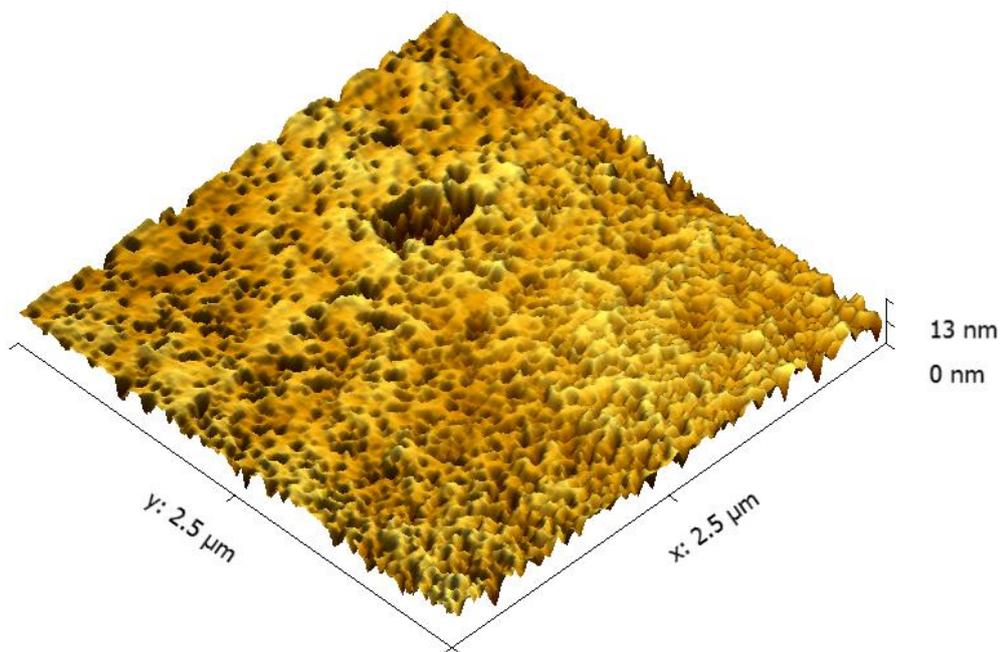
Nas figuras 7 e 8, é possível observar a grande porosidade da matriz polimérica de quitosana, preparada na formulação escolhida e desidratada. Esta porosidade é determinante nas propriedades de barreira do filme.

Figura 7 – Imagem em 2D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 – Imagem em 3D de um filme de quitosana, preparado na formulação escolhida, obtida por MFA.

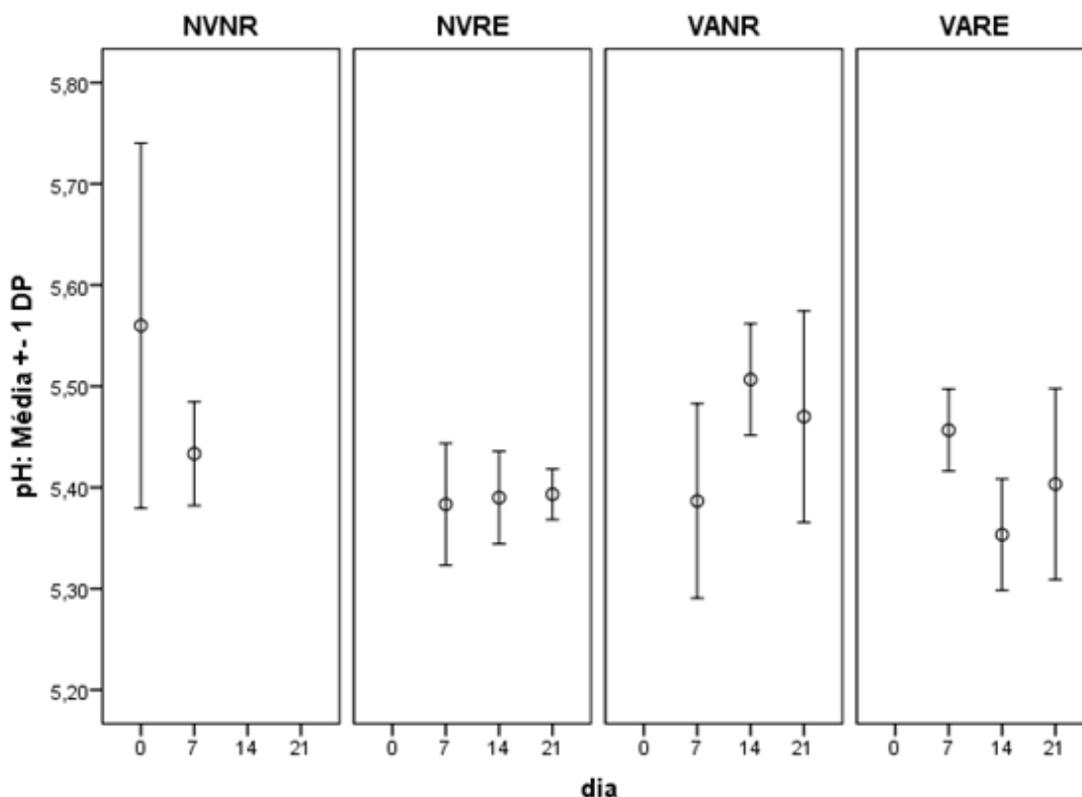


Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.8 Determinação de pH de amostras de carne

Para este parâmetro, as únicas constatações foram que, embora tenha havido uma pequena variação entre os tratamentos no 14º dia, as médias de todos eles se mantiveram em 5,42 no 7º, 14º e 21º dia, havendo uma tendência geral não significativa de redução entre o pH inicial, sem tratamento, que era de 5,56, conforme pode ser visualizado no gráfico 3. Este valor final médio de pH foi próximo ao obtido por Laville *et al.* (2009) para carne fresca *in natura*, embalada a vácuo em PVC, também após 21 dias, que foi de 5,46.

Gráfico 3 – Médias e desvios-padrão do pH



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR – a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida;

Na análise estatística para este parâmetro, foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5% e os softwares utilizados foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8. Na tabela 8, abaixo, é possível ver que houve diferença significativa entre as médias de VANR e os outros dois tratamentos, no 14<sup>o</sup>.

Tabela 8 – Médias e desvios-padrão (dp) dos valores de pH

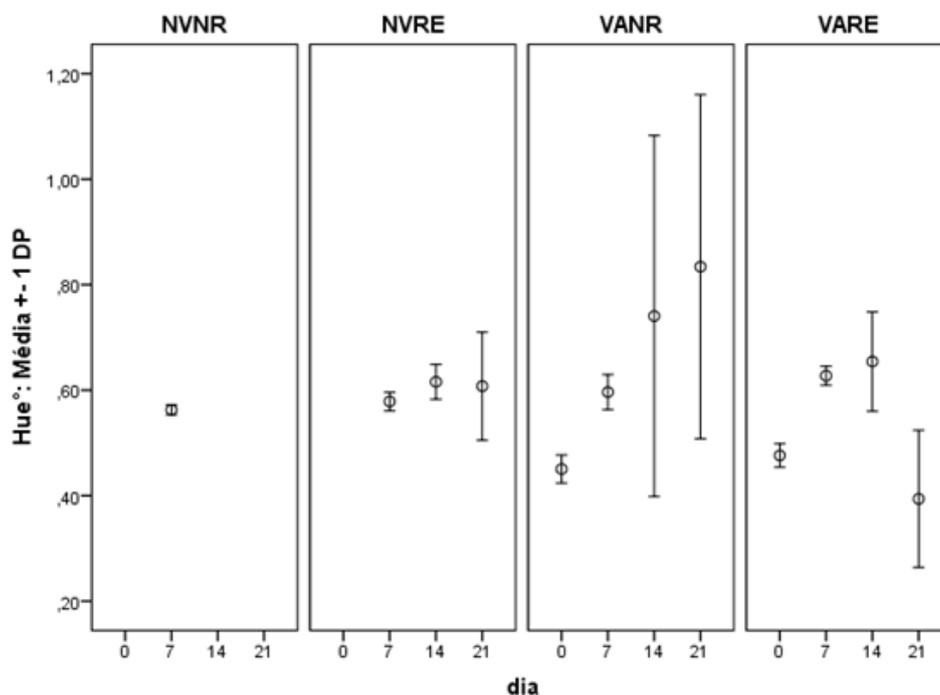
Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
pH	NVNR	5,43a	0,05	-	-	-	-
	NVRE	5,38a	0,06	5,39 a	0,05	5,39a	0,03
	VANR	5,39a	0,10	5,51 b	0,06	5,47a	0,10
	VARE	5,46a	0,04	5,35 a	0,06	5,40a	0,09

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

#### 4.9 Avaliação colorimétrica de amostras de carne

No gráfico 4, é possível ver a variação das cores, por meio dos valores dos ângulos de Hue, das diferentes amostras, ao longo das semanas, lembrando que 0° corresponde à cor vermelha.

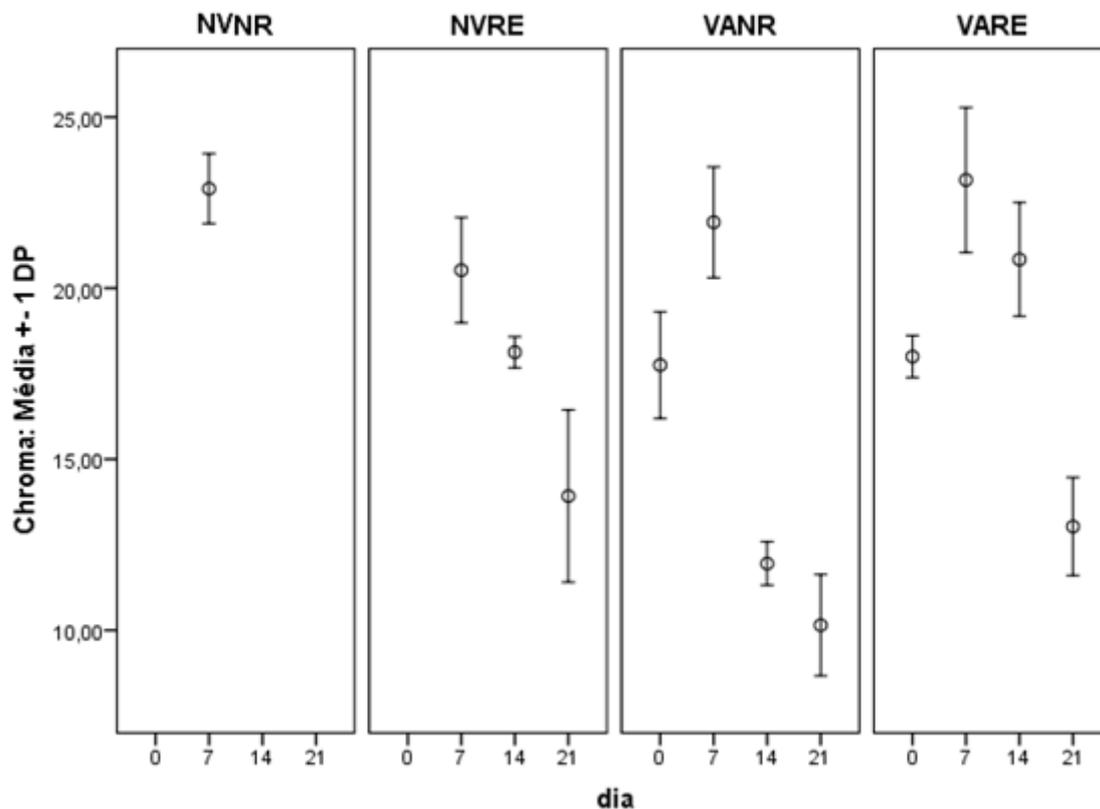
Gráfico 4 - Médias e desvios-padrão de ângulo de Hue



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida.

No gráfico 5, é possível observar o comportamento da matiz das cores ao longo das semanas e com relação aos tratamentos, sendo que ocorre um aumento no 7º dia em relação ao 1º, seguido por duas quedas no 14º e 21º dia.

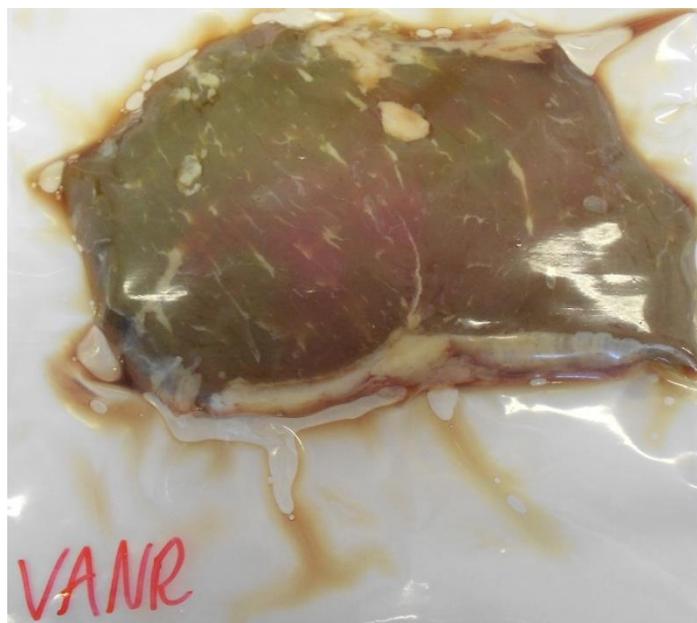
Gráfico 5 - Médias e desvios-padrão de croma



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida

As figuras 9, 10 e 11 são de amostras de carne no 21º dia de experimento. É possível observar que a amostra VARE (11) apresenta uma coloração mais próxima do que se espera para carne bovina fresca, em relação as amostras VANR (9) e NVRE (10).

Figura 9 - Amostra de carne embalada a vácuo em PVC e não revestida no 21º dia de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 - Amostra de carne embalada sem vácuo em PVC e revestida no 21º dia de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11 - Amostra de carne embalada a vácuo em PVC e revestida no 21º dia de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5%. Na tabela 7, abaixo, é possível apenas observar que no 7º dia houve uma pequena diferença entre as médias dos diferentes tratamentos, com relação ao ângulo de Hue e na tabela 8, foram observadas diferenças no 14º dia com relação à matiz (Croma) entre os três tratamentos, sendo que as melhores condições foram VARE e NVRE, nesta ordem.

Tabela 9 - Médias e desvios-padrão (dp) de ângulos de Hue

Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
Hue	NVNR	0,56 a	0,01	-	-	-	-
	NVRE	0,58 a	0,02	0,62a	0,03	0,61a	0,10
	VANR	0,60 ab	0,03	0,74a	0,34	0,83a	0,33
	VARE	0,63 b	0,02	0,65a	0,09	0,39a	0,13

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

Tabela 10 - Médias e desvios-padrão (dp) de cromagem

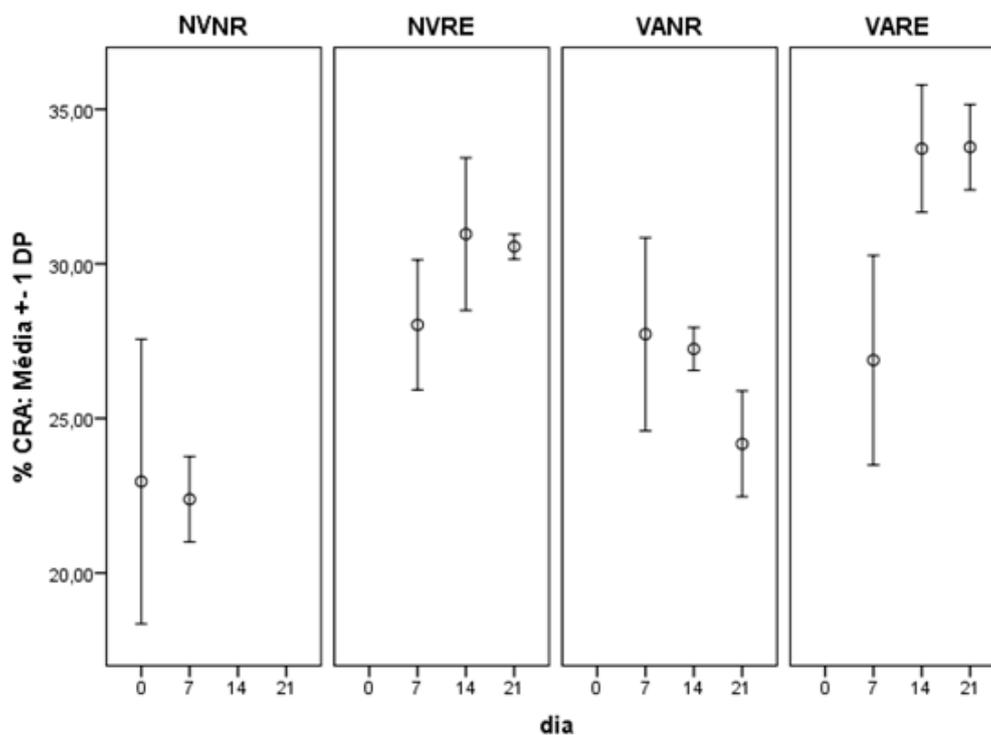
Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
Cromagem	NVNR	22,91a	1,02	-	-	-	-
	NVRE	20,53a	1,54	18,13 b	0,45	13,92a	2,52
	VANR	21,93a	1,62	11,95 a	0,64	10,15a	1,48
	VARE	23,16a	2,12	20,84 c	1,67	13,03a	1,43

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

#### 4.10 Monitoramento de capacidade de retenção de água (CRA)

No 7º dia, foi possível observar, no gráfico 6 que a média das amostras NVNR foi inferior às demais. A partir do 14º dia, as médias de CRA das amostras VANR começaram a diminuir e das NVREs e VAREs a aumentar, sendo que no 21º dia a CRA média das VANRs diminuiu ainda mais e das REs se mantiveram, como pode ser observado no gráfico 6.

Gráfico 6 - Médias e desvios-padrão de CRA (%)



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5% e os softwares utilizados foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8. Na tabela 9, é possível observar que no 14<sup>o</sup> dia há diferença estatisticamente significativa entre as médias de NVRE, VANR e VARE, porém não significativa entre NVRE e VARE. Já no 21<sup>o</sup> dia os valores destas médias se distanciaram sendo que a CRA média das amostras VARE foi superior à de NVRE, que por sua vez superou VANR.

Tabela 11 - Médias e desvios-padrão (dp) de CRA (%)

Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
CRA	NVNR	22,38a	1,38	-	-	-	-
	NVRE	28,03a	2,10	30,96 a b	2,47	30,56 b	0,40
	VANR	27,73a	3,12	27,25 a	0,70	24,18 a	1,71
	VARE	26,88a	3,39	33,73 b	2,06	33,77 c	1,38

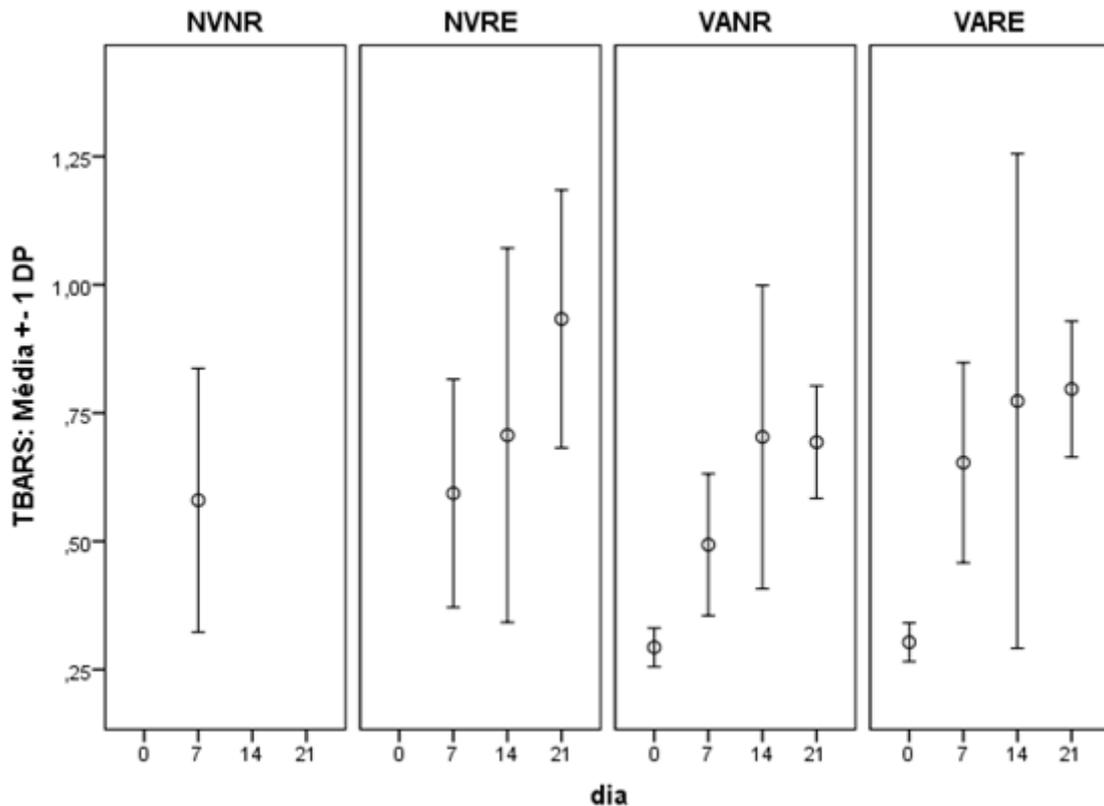
NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

Baseado nestas medidas e análises realizadas, é possível afirmar/sugerir que o revestimento de quitosana e glicerol favoreceu a retenção de água em amostras de carne *in natura* (*L. dors*) fatiada, ao longo do tempo de maturação utilizado neste estudo, que foi de 21 dias, o que confere maior suculência ao produto. Além disso, quando embalada a vácuo esta retenção é ainda maior.

#### 4.11 Avaliação de oxidação lipídica (TBARS)

No decorrer do experimento houve um aumento significativo no valor médio deste parâmetro, para todos os tratamentos (laudo em anexo), porém a diferença entre eles foi muito pequena, conforme pode ser observado no gráfico 7.

Gráfico 7 - Médias e desvios-padrão de TBARS



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5% e os softwares utilizados foram o IBM SPSS Statistics versão 20 e o Statistica versão 8. Na tabela 10 é possível observar que não há qualquer diferença significativa entre as médias, pois nem existem letras junto as médias na tabela e as barras de erros sempre coincidem no gráfico 7.

Tabela 12 - Médias e desvios-padrão de TBARS (laudo em anexo)

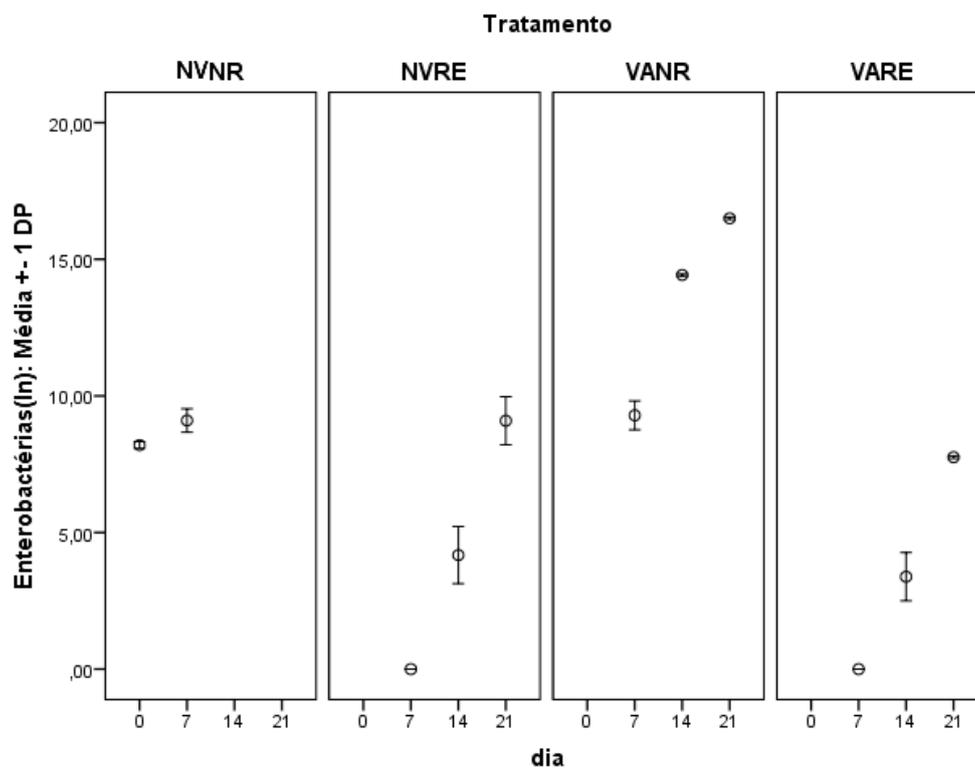
Variável	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
TBARS	NVNR	0,58a	0,26	-	-	-	-
	NVRE	0,59a	0,22	0,71 <sup>a</sup>	0,36	0,93a	0,25
	VANR	0,49a	0,14	0,70 <sup>a</sup>	0,30	0,69a	0,11
	VARE	0,65a	0,20	0,77 <sup>a</sup>	0,48	0,80a	0,13

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

#### **4.12 Avaliação da eficiência do revestimento comestível à base de quitosana na inibição do crescimento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* bactérias ácido-láticas (BALs) e psicotróficas totais em amostras de carne**

Com relação às enterobactérias, foi possível observar que houve um efeito bacteriostático nas amostras revestidas com solução de quitosana, que retardou a proliferação delas em pelo menos uma semana, sendo que o vácuo auxiliou neste efeito, conforme pode ser visto no gráfico 8, quando comparamos aos números de NVRE, maiores que os de VARE.

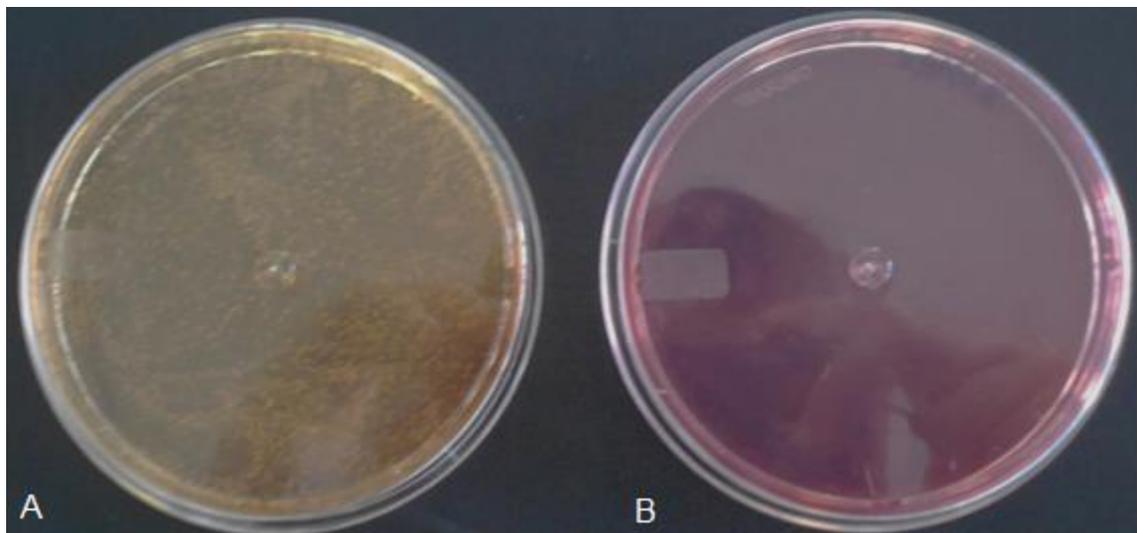
Gráfico 8 - Médias e desvios-padrão em  $\ln \text{UFC.mL}^{-1}$  para Enterobactérias totais



NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Valores transformados em ln

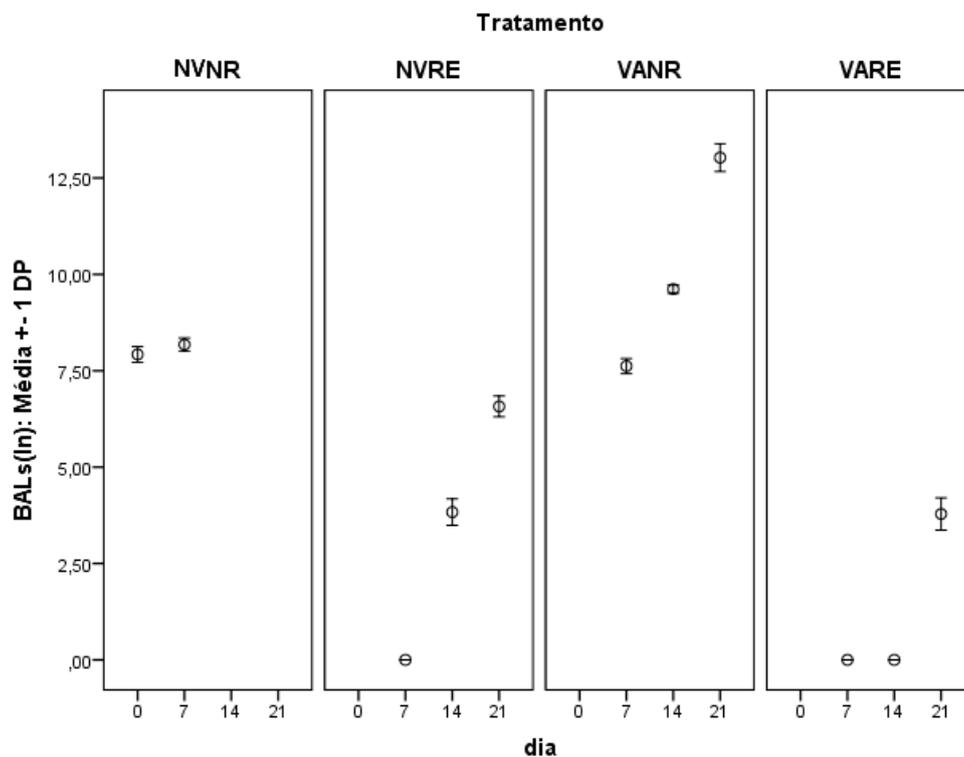
Na figura 12, é possível observar a diferença na coloração do meio de cultura MacConkey, quando ocorre crescimento de enterobactérias que degradam lactose (A) ou não (B). Isso ocorre devido à presença do corante vermelho neutro, que indica quando o pH inicial em torno de  $7,1 \pm 0,2$  diminui para 6,8 ou menos, tornando o meio amarelado.

Figura 12 – Placas de Petri contendo meio de cultura de MacConkey com crescimento de enterobactérias (A) e sem crescimento (B).



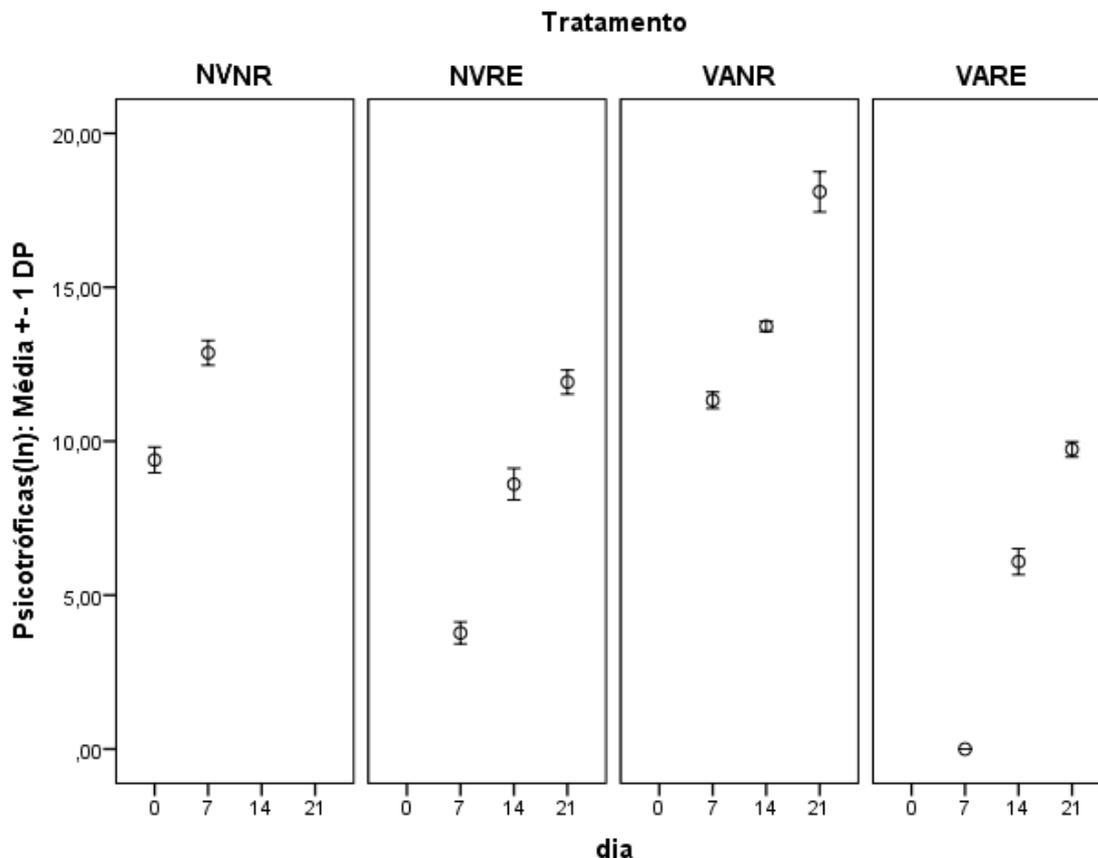
Fonte: Arquivo pessoal.

Para as BALs o efeito do revestimento foi ainda mais interessante, pois nas amostras VARE não houve nenhum crescimento até o 14<sup>o</sup> dia, embora tivessem crescimento neste mesmo dia nas amostras NVRE. Estes dados surpreendem pelo fato desses microrganismos serem microaerófilos ou estritamente anaeróbios. No entanto, também tenham encontrado condições favoráveis no 7<sup>o</sup> dia nas amostras NVNR, como podemos observar no gráfico 9. Uma provável explicação, seria o surgimento de microambientes favoráveis, com reduzidas concentrações de oxigênio. Nas amostras VANR o crescimento deste grupo de bactérias foi absolutamente superior.

Gráfico 9 - Médias e desvios-padrão em  $\ln \text{UFC.mL}^{-1}$  para BALS totais

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Valores transformados em  $\ln$

As bactérias psicrófilas, ou psicrófilas, só sofreram inibição total na primeira semana de quantificação nas amostras VARE. Entretanto, é possível perceber no gráfico 10 que o revestimento comestível, mesmo sem vácuo, inibiu o crescimento deste grupo. A partir do 14º dia ocorreu elevação no crescimento destas bactérias nas amostras tratadas com solução de quitosana a 1% (gráfico 10) porém este número só se aproxima do parâmetro inicial no 21º dia. O crescimento deste grupo de bactérias nas amostras VANR foi superior, sendo superado apenas pelo grupo NVNR no 7º e único dia deste, como pode ser visualizado no gráfico 10.

Gráfico 10 - Médias e desvios-padrão em  $\ln \text{ UFC.mL}^{-1}$  para Psicrotróficas totais

NVNR – sem vácuo não revestida; NVRE - sem vácuo revestida; VANR - a vácuo não revestida; VARE – a vácuo revestida. Valores transformados em ln

Na análise estatística para este parâmetro, também foi feita uma análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Duncan. O nível de significância adotado foi de 5%. Na tabela 11 é possível observar que, para todos os grupos de bactérias avaliados, só não há diferença significativa estatisticamente entre os valores obtidos no 7º dia para os tratamentos NVNR e VANR, NVRE e VARE no grupo das enterobactérias, e entre NVRE e VARE no grupo das BALs. No 14º dia só não há diferença entre NVRE e VARE para o grupo das enterobactérias. No 21º dia todos os valores são estatisticamente distintos.

Tabela 13 - Médias (In UFC.mL<sup>-1</sup>) e desvios-padrão (dp) de todos os bioensaios

Grupo	Condição	Dias					
		7		14		21	
		Média	Dp	Média	dp	Média	dp
Entero*	NVNR	9,1016 b	0,2488	-	-	-	-
	NVRE	0,00 a	0,0000	4,1733 a	0,6031	9,0899 b	0,5067
	VANR	9,2898 b	0,3059	14,4265 b	0,0235	16,5003 c	0,0281
	VARE	0,00 a	0,0000	3,3821 a	0,5107	7,7572 a	0,0273
BAL*	NVNR	8,1793 c	0,0972	-	-	-	-
	NVRE	0,00 a	0,0000	3,8336 b	0,1977	6,5745 b	0,1555
	VANR	7,6211 b	0,1118	9,6165 c	0,0618	13,0302 c	0,2070
	VARE	0,00 a	0,0000	0,00 a	0,0000	3,7854 a	0,2417
Psicro*	NVNR	12,8710 d	0,2316	-	-	-	-
	NVRE	3,7716 b	0,2054	8,6043 b	0,2961	11,9198 b	0,2258
	VANR	11,3292 c	0,1556	13,7336 c	0,0966	18,1009 c	0,3768
	VARE	0,00 a	0,0000	6,0882 a	0,2453	9,7357 a	0,1427

Médias acompanhadas por letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo teste de Duncan

\* Variáveis transformadas para realização dos testes - ln

## 4.13 Caracterização das nanopartículas de própolis

### 4.13.1 Caracterização do extrato de própolis

Foi obtido um extrato de coloração verde escura, com odor característico, e um sedimento mais claro no fundo, de compostos resinosos insolúveis em etanol, que foi deixado precipitar.

A absorbância média do extrato etanólico de própolis – EEP, diluído 40X foi 0,373, o que é equivalente a 96,78 mg de fenóis totais equivalentes em ácido gálico por grama de extrato ou 9,68%. Em própolis em bruto, o teor mínimo requerido de compostos fenólicos é de 5% (m/m) de fenóis totais equivalentes em ácido gálico por grama de extrato (Brasil, 2001).

O conteúdo de flavonoides totais equivalentes em quercetina no EEP foi de 42,28 mg.g<sup>-1</sup> ou 4,23%. Em própolis bruta, o teor mínimo requerido de flavonoides é de 0,5% (m/m) (Brasil, 2001). Cabral (2012) obteve 0,32% e 6,15%

em extratos diferentes. Pelatti (2013) obteve 0,25% e 16,8%, também em extratos diferentes. Mello (2012) obteve a partir de cerca de 3,55% em extrato aquoso até 10,06% em extrato etanólico. A quantidade de flavonoides é muito variável e depende do tipo de própolis (origem), do solvente e do método de extração.

A capacidade antioxidante do EEP foi de 79,62% em relação ao padrão de controle (Trolox). Cabral (2012), avaliou a capacidade antioxidante de dois diferentes extratos etanólico de própolis, obtendo os valores de 21,7 e 53.0%. Mello (2012), na mesma análise, usando trolox como padrão, obteve um valor de quase 50%. Campos (2014) chegou a obter  $98 \pm 0,4\%$  de capacidade antioxidante, também com extrato etanólico de própolis.

Este resultado demonstra que o extrato utilizado apresenta elevada capacidade antioxidante, embora existam outros mais eficientes ainda.

Dos sete compostos-padrão avaliados, foram identificados cinco deles presentes no EEP utilizado, conforme pode ser observado nas gráficos 11 e 12. Foram eles: ácido caféico, crisina, ácido ferúlico, campferol, ácido p-cumárico, quercetina e sakuranetina.

Gráfico 11 – Cromatograma do extrato de própolis com compostos identificados

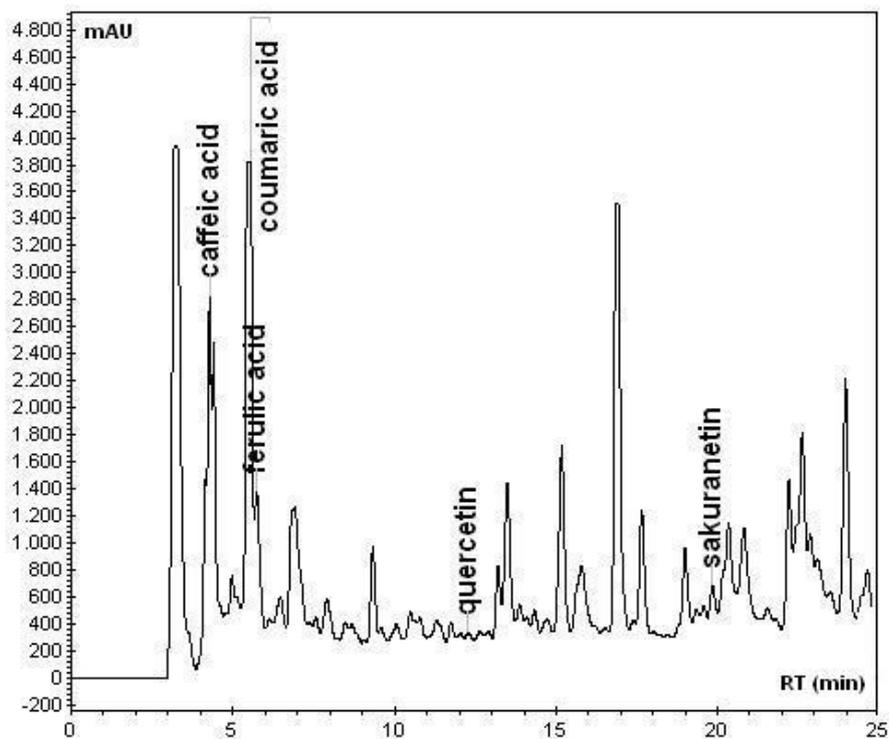
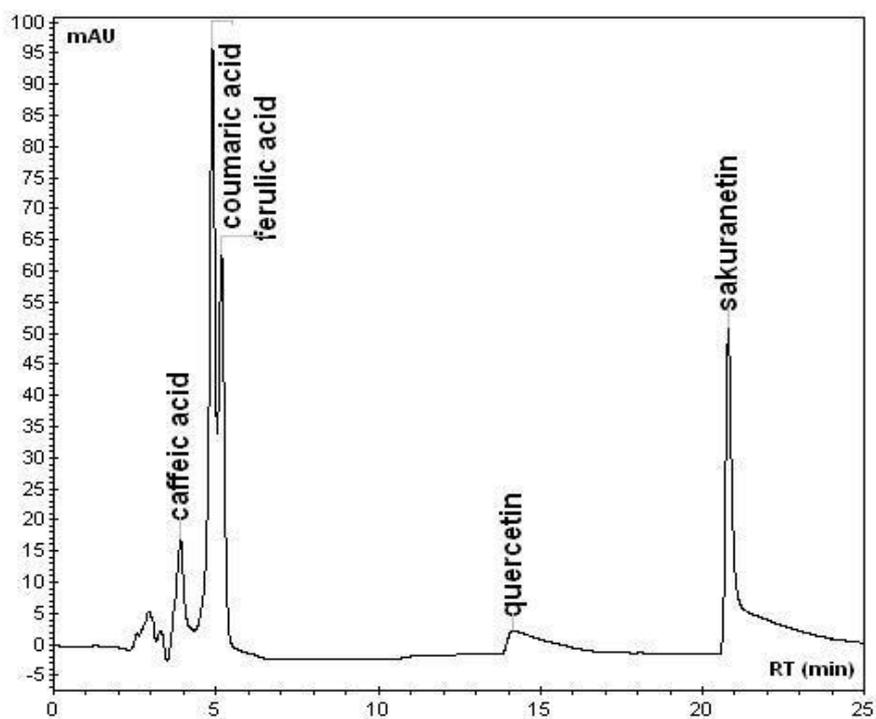


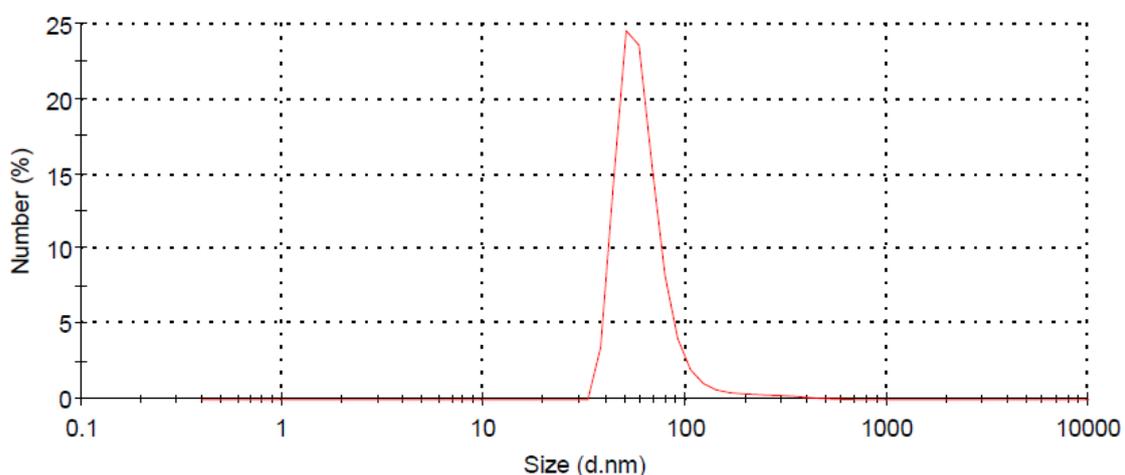
Gráfico 12 – Cromatograma dos compostos fenólicos padrão



#### 4.13.2 Caracterização das nanopartículas de própolis

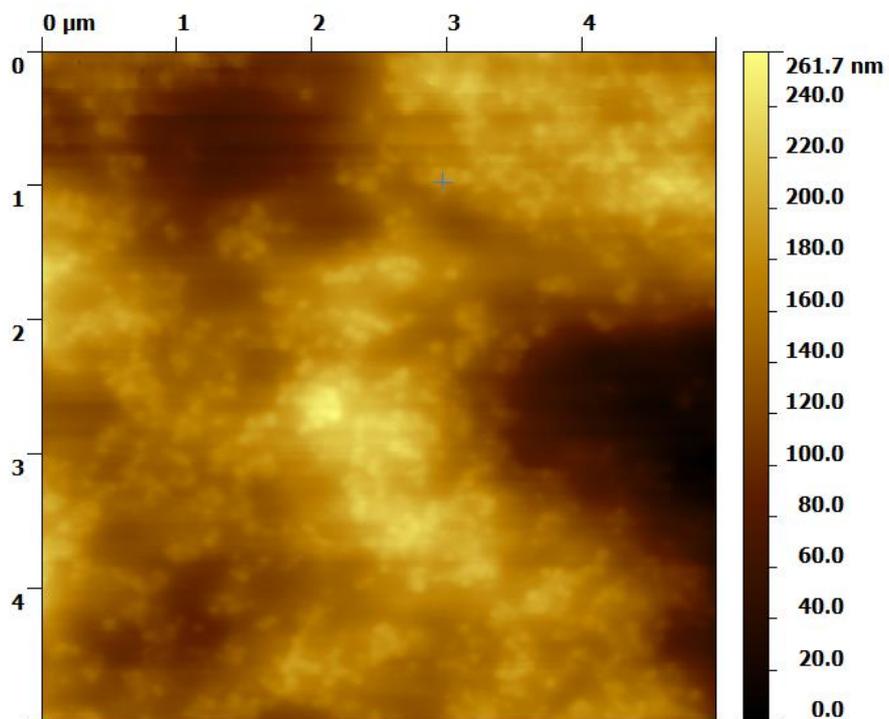
Foi obtida uma solução de coloração amarela clara, com odor mais suave, em relação ao extrato e sem sedimento. Após medições, do diâmetro médio de partículas, pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL), percebeu-se que o diâmetro médio das nanopartículas, em pH 4,61, era de 65,46 nm, conforme pode ser observado no gráfico 13.

Gráfico 13 – Determinação de diâmetro médio de nanopartículas de própolis por EDL.



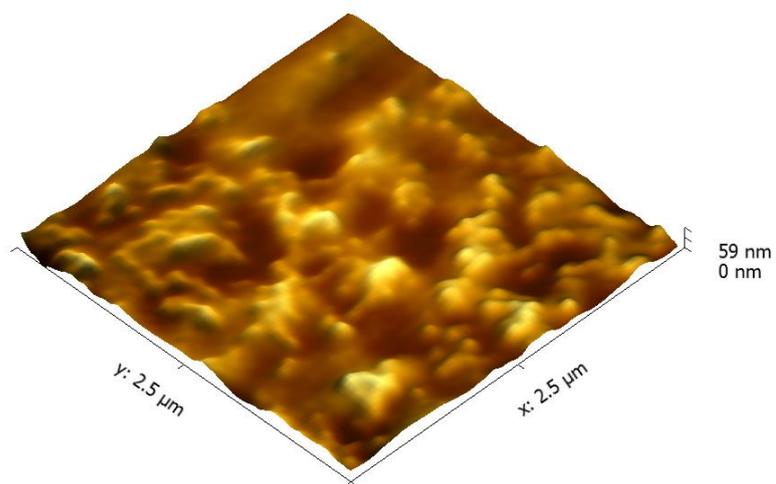
Pelas medições feitas com o software Gwyddion (versão 2.31), em imagens obtidas por MFA, como pode ser observado nas figuras 13, 14 e no gráfico 14, pôde-se concluir que o tamanho das nanopartículas (pH 4,61) foi de aproximadamente 75 nm.

Figura 13 - Imagem em 2D de nanopartículas de própolis, obtida por MFA.



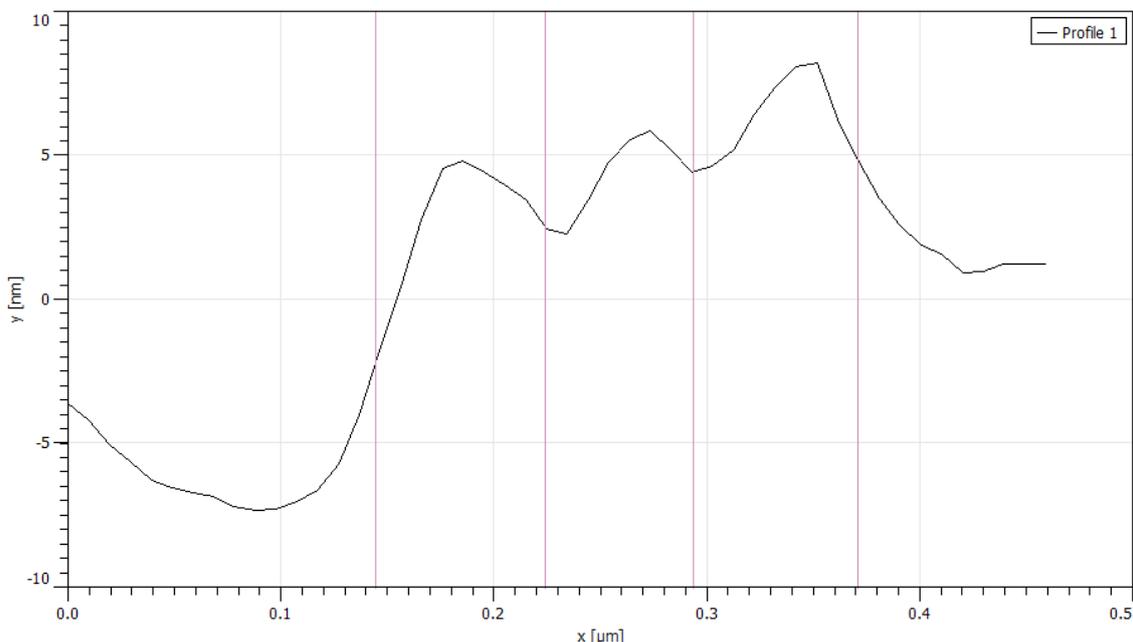
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 - Imagem em 3D de nanopartículas de própolis, obtida por MFA.



Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico 14 – Determinação do tamanho de nanopartículas de própolis por MFA



Uma possível explicação para essa diferença de tamanhos, é que se tratam de técnicas diferentes de medição do tamanho das partículas. Outra hipótese é a de não existir uniformidade no tamanho das nanopartículas, devido à formação de aglomerados.

#### 4.14 Determinação da MIC do extrato e das nanopartículas de própolis

Foi feito teste t-student, para comparar a diferença entre as MICs de todas as concentrações de EEP e NPs testadas para as todas as espécies bacterianas e obteve-se um nível de significância (p) inferior a 3% para todas as comparações de concentrações.

Conforme pode ser observado na tabela 12, houve inibição de todas as espécies submetidas a bioensaio. Isto foi inesperado, em especial no caso das espécies Gram-negativas, pois pela literatura é relatado que a própolis possui melhor efeito contra Gram-positivas (Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Jug *et al.*, 2014).

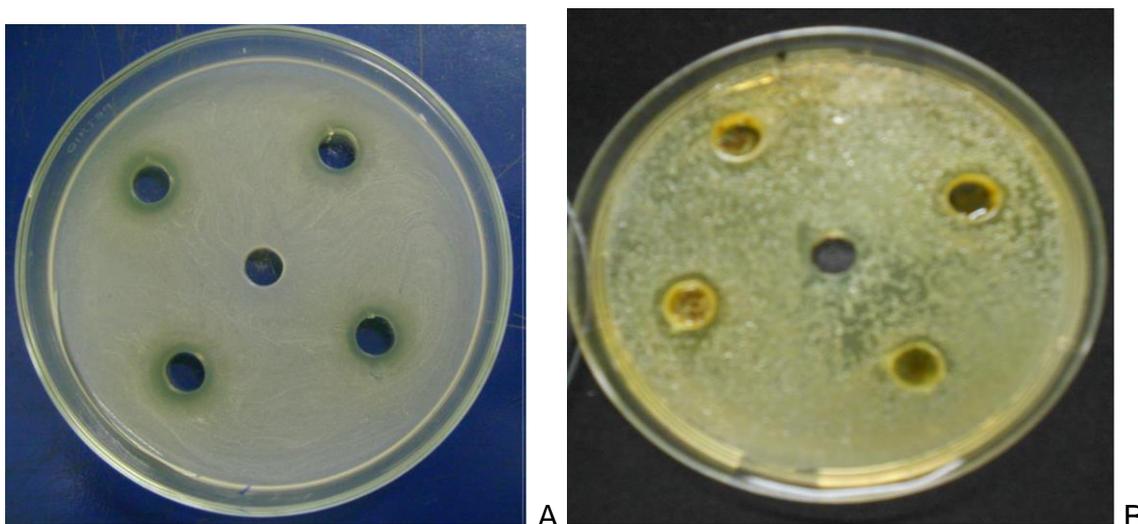
Tabela 14 – MICs e tamanho médio dos halos inibitórios de nanopartículas e extrato de própolis frente a 8 gêneros microbianos comumente presentes em carne bovina.

Micro-organismo	Concentrações mínimas inibitórias - NPs (MICs) (g.L <sup>-1</sup> )	Tamanhos dos halos de inibição (mm)	Concentrações mínimas inibitórias – EEP (MIC) (g.L <sup>-1</sup> )	Tamanhos dos halos de inibição (mm)
<i>Enterobacter helveticus</i> (Gram -)	8,14	1,53	24,55	1,33
<i>Salmonella Thompson</i> (Gram -)	2,28	1,73	12,28	2,33
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	4,10	1,60	12,28	1,87
<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram +)	6,10	1,67	12,28	1,93
<i>Lactobacillus buchneri</i> (Gram +)	8,14	1,47	24,55	1,60
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Gram +)	6,10	0,90	12,28	0,67
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram +)	6,10	2,10	12,28	3,50
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	2,03	1,97	2,46	3,67

*S. aureus* (Gram +), ilustrada na figura 3-A, foi a espécie mais sensível a ambas as formas da própolis testadas, com MIC de 2,03 para as NPs e 2,46 g.L<sup>-1</sup> para EPE. Em seguida, *S. Thompson* e *E. coli*, ambas Gram -, com MICs respectivamente de 2,28 e 4,10 g.L<sup>-1</sup> para as NPs e de 12,28 g.L<sup>-1</sup> para EEP para ambas. Curiosamente, as espécies mais resistentes, dentre as oito avaliadas, foram *E. helveticus* (Gram -), ilustrada nas figuras 3-B e *L. buchneri* (Gram +),

com MICs de 8,14 e 24,55 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente para NPs e EEP. Esta constatação, embora haja uma diferença no tamanho dos halos inibitórios, se opõe a hipótese de que todas as Gram + sejam mais sensíveis à própolis. Talvez esta sensibilidade não esteja ligada somente à estrutura da parede celular das bactérias quanto se supõe.

Figura 15 – Exemplos de bioensaios de inibição com presença de halos de inibição; A) *S. aureus* e EEP; B) *E. helveticus* e NPs.



Fonte: Arquivo pessoal.

Porém, tanto no caso do extrato etanólico de própolis (EEP) quanto das nanopartículas (NPs), todas as MICs ainda foram consideradas relativamente elevadas para a aplicação destas substâncias em revestimento comestível para carne, devido à intensa coloração e odor provocados pelas mesmas. Entretanto, existe a possibilidade de outras aplicações, como por exemplo em hambúrgueres ou carne bovina processada e pré-temperada.

## 5. CONCLUSÕES

- Detectou-se que a permeabilidade do filme produzido neste trabalho foi em torno de 4 a 30 vezes menor que a observada para o gás O<sub>2</sub> e de pouco menos de 10 até mais de 40 vezes maior em CO<sub>2</sub>, considerando-se os trabalhos citados. Isso é muito importante na manutenção da cor vermelha (oximioglobina), desejável na carne, pois ocorre entrada/retenção de O<sub>2</sub> e liberação de CO<sub>2</sub>, cuja concentração atmosférica é muito menor que a do O<sub>2</sub> (0,035 e 20,95% respectivamente);
- O filme desenvolvido no presente trabalho demonstrou alto teor de umidade e baixa solubilidade relativos, quando comparado a outros trabalhos, o que é interessante para aplicação em carne, pois mantém sua propriedade de barreira e integridade, mesmo sob elevada umidade e possível atividade de água;
- Com relação à coloração (Hue) das amostras, no 7<sup>o</sup> dia houve uma pequena desvantagem das amostras revestidas e a vácuo em relação às que não estavam a vácuo. Porém, no 14<sup>o</sup> dia o brilho (Croma) das amostras nesta condição foi superior e não houve diferença significativa na coloração. Portanto, baseado nas análises deste trabalho, esta condição ainda pode ser considerada mais vantajosa, quando se avalia a carne por um período de tempo maior;
- O filme de quitosana desenvolvido no presente trabalho, melhorou a capacidade de retenção de água (CRA) de amostras de carne, o que auxilia na desejada suculência do produto, além de reduzir a Aw e consequentemente auxiliar na conservação do mesmo;
- O filme comestível à base de quitosana, selecionado para aplicação em carne fresca *in natura*, inibiu de maneira muito significativa o crescimento de enterobactérias, bactérias ácido-láticas (BALs) e psicrotróficas totais, o que certamente poderá aumentar o tempo de prateleira deste produto;
- O extrato de própolis utilizado no presente trabalho apresentou teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante relativamente elevados em comparação a outros encontrados na literatura;

- Para todas as concentrações de EEP e NPs testadas, com todas as espécies bacterianas, obteve-se resultados melhores com as NPs, estatisticamente comprovados, a um nível de significância ( $p$ ) inferior a 3%, o que é vantajoso devido à redução na concentração de própolis;

## 6. REFERÊNCIAS

- ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B.; MANCIO A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 135-149, jul./set. 2005.
- ANDRADE, E. N.; SILVA, R.A.M.S.; ROÇA, R. O. Manejo pré-abate de bovinos de corte no Pantanal, Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 58, n. 222 p. 304, 2009.
- ASSIS, O. B. G.; ALVES, H. C. Metodologia Mínima para a Produção de Filmes Comestíveis de Quitosana e Avaliação Preliminar de seu Uso como Revestimento Protetor em Maçãs Cortadas. Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP - **Comunicado Técnico**, v. 49, p. 5, 2002.
- ASTM D882-91 (em anexo). Standard test methods for tensile properties of thin plastic. **Annual Book of ASTM Standards**, Amer. Soc. for Testing & Materials, Philadelphia, PA, 1991.
- ASTM-D-3985-02 (em anexo). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. **Annual book of ASTM**, A.S.F.T.O. Materials, ed., Philadelphia, PA, 2002.
- BARNES, E. M.; INGRAM, M. The effect of redox potencial on the growth of *Clostridium welchii* isolated form horse muscle. **J. Appl. Bact.**, v. 19, p. 117-128, 1956.
- BATE-SMITH, E. C.; BENDALL, J. R. *Rigor mortis* and adenosinetriphosphate. **The Journal of Physiology**, v. 106, p. 177-185, 1947.
- BATE-SMITH, E. C.; BENDALL, J. R. Factors determining the time course of *rigor mortis*. **The Journal of Physiology**, v. 110, p. 47-65, 1949.

BONILLA, J.; ATÁRES, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 9-16, 2012.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 103–120, 1996.

BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; CERQUEIRA, M. A.; ROCHA, C. M. R.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; VICENTE, A. A. Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 111–118, 2011.

BRANDÃO, F. T.; FERREIRA JUNIOR, J. C.; BRICHI, L. O.; MIRANDA, I. T. P. Exportação da carne bovina nacional: os desafios que o setor enfrentará nos próximos anos frente às novas exigências do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, v. 4, n. 2, p. 7-14, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Crescimento da demanda de alimentos no Brasil, **Nota Técnica**, Dezembro, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Valor Bruto da Produção. Dezembro, 2014.

BRIGHTWELL, G.; CLEMENS, R.; URLICH, S.; BOREMA, J. Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 334–339, 2007

BRUHN, C. Food labelling: consumer needs, in Blanchfield, J. R. (ed.), **Food labelling**, Woodhead Publishing Limited, Cambridge. p. 320, 2000.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DIAZ, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 8, p. 1452-1459, 2008.

- CERQUEIRA, M. A.; LIMA, A. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; MOREIRA, R. A.; VICENTE, A. A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1456-1462, 2009.
- CHOULIARA, E.; KARATAPANIS, A.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. (2007) Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4° C. **Food Microbiology 24**: 607–617p.
- DELAZARI, I. (1977) Microbiologia de carnes. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 52, Campinas/SP, p. 25-60, 1977.
- DITCHFIELD, C. **Estudo dos métodos para medida de atividade de água**. 2000, 195p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry 114**: 1173–1182p.
- ECONOMOU, T.; POURNIS, N.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I.N. (2009) Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. **Food Chemistry 114**: 1470–1476p.
- ERDÖS, T. Rigor, contracture and ATP. **Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged**, v. 3, n. 51, p. 56, 1943.
- FEITOSA, T. Contaminação, conservação e alteração da carne. **Embrapa-CNPAT**, Fortaleza/CE, V. 34, 26p., 1999
- FELÍCIO, P.E. Fatores que Influenciam na Qualidade da Carne Bovina. In: A. M. Peixoto; J. C. Moura; V. P. De Faria. (Org.). *Produção de Novilho de Corte*. 1.ed. Piracicaba/SP. **FEALQ**, p. 79-97, 1997.
- FELLOWS, P. *Food processing technology: principles and practice*. **Woodhead Publishing Limited**, Cambridge, 34p., 2000.
- FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v. 80, p. 12–19, 2008.

FIELD, R.A., RILEY, M.L. AND CHANG, Y.O. Free amino acid changes in different aged bovine muscles and their relationship to shear values. **J. Food Sci.**, v. 36, p. 611-612, 1971.

FUNDO, J. F.; GALVIS-SANCHEZ, A. C.; DELGADILLO, I.; SILVA, C. L. M.; QUINTAS, M. A. C. The Effect of Polymer/ Plasticiser Ratio in Film Forming Solutions on the Properties of Chitosan Films. **Food Biophysics**, v. 10, p. 324–333, 2015.

GILL, C. O., E NEWTON, K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, v.3, p. 207-217, 1978.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packing: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agriculture origin. **Food Packing and Preservation**, p. 159-181, 1994.

GONZÁLEZ, L.; BISPO, E.; MORENO, T.; MONSERRAT, L.; FRANCO, D. Enhancement of shelf life from meat proceeding from blond galician calves using antioxidant. **Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry**, v. 10, p. 3296-330, 2008.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. Porto Alegre/ RS, **Editora Artmed - 6ª ed**: 711 p., 2005.

JUG, M.; KON, M. Z.; KOSALEC, I. (2014) Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT - Food Science and Technology 57**: 530-537p.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. (2009) Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry 116**: 452–461

KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G.M.B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. (2000) In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology 45**: 141-148p.

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

LAVILLE, E.; SAYD, M. M.; MORZEL, M.; BLINET, S.; CHAMBON, C.; LEPETIT, G. R.; HOCQUETTE, J. F. Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 10755–10764, 2009

LAWRIE, R.A. Meat science, 2ª ed., **Pergamon on Press**, Oxford, p.71, 1974.

LAWRIE, R. A. Meat science, 4ª ed., **Pergam on Press**, Oxford, p.44, 1985  
Marggrander, K.; Hofmann, K. (1997) Reduction of freezer burn and loss on drying during long term storage of pork with gelatin spray solution. **Fleischwirtschaft 77(1)**: 19–20p.

LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P. (2004) A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloids 19(2)**: 303–311p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) (2015) **Projeções do Agronegócio**, Brasília, 133p.

MOSSEL, D.A.A.; MORENO-GARCIA, B. - Microbiologia de los alimentos - Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. **Acribia**, Zaragoza, Espanha, 375p., 1994.

NEVES, M. Estratégias para a Carne Bovina no Brasil. São Paulo, **Ed. Atlas**. 2012.

OBBINGER, J.L.; KRAFT, A.A. Oxidation - reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Food Science**, v. 38, 1108p., 1973.

MURPHY, K. M.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P. Effect of varying the gas headspace to meat ratio on the quality and shelf-life of beef steaks packaged in high oxygen modified atmosphere packs. **Meat Science**, v. 94, p. 447–454, 2013.

PELLISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. **J. Agric. Food Chem.** V. 57, p. 7499–7504, 2009.

- PUGA, D.M.U.; CONTRERAS, C.J.C.; TURNBULL, M. R. Avaliação do amaciamento de carne bovina de dianteiro (*Triceps brachii*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, e. 1, p. 88-96, 1999.
- SARAIVA, C. M. T. Influência do pH final e tipo de embalagem na conservação de carne de bovino da raça maronesa. **Tese – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro**. Vila Real - Portugal, 297p., 2008.
- URBAIN, W.M. Conservação de la carne. In: Price, J.F.; Schweigert, B.S. - Editor - *Ciência de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza, Espanha, **Acribia**, 413-461p., 1976.
- USDA – United States Department of Agriculture. Acesso em 20 de julho de 2015 [http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2012/livestock\\_0412.pdf](http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2012/livestock_0412.pdf)
- VENTURINI, A. C.; CASTILLO, C. J. C.; FARIA, J. A. F. Revisão: sistemas de embalagem para carne bovina fresca em atmosfera modificada. **Braz. J. Food Technol.**, v. 12, n. 2, p. 128-137, abr./jun. 2009
- ZISMAN, W.A. Contact angle, Wettability and Adhesion. **Advances in Chemistry**, v. 43, p. 1-51, 1964.

## 7. ANEXOS



Designation: D 3985 – 02<sup>ε1</sup>

### Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor<sup>1</sup>

This standard is issued under the fixed designation D 3985; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

<sup>ε1</sup> NOTE—A footnote reference was deleted in March 2004.

#### 1. Scope

1.1 This test method covers a procedure for determination of the steady-state rate of transmission of oxygen gas through plastics in the form of film, sheeting, laminates, coextrusions, or plastic-coated papers or fabrics. It provides for the determination of (1) oxygen gas transmission rate ( $O_2$ GTR), (2) the permeance of the film to oxygen gas ( $PO_2$ ), and (3) oxygen permeability coefficient ( $P'O_2$ ) in the case of homogeneous materials.

1.2 This standard does not purport to address all of the safety problems, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.

1.3 This test method does not purport to be the only method for measurement of  $O_2$ GTR. There may be other methods of  $O_2$ GTR determination that use other oxygen sensors and procedures.

#### 2. Referenced Documents

2.1 *ASTM Standards*:<sup>2</sup>

- D 1434 Test Method for Determining Gas Permeability Characteristics of Plastic Film and Sheetting
- D 1898 Practice for Sampling of Plastics
- F 1927 Test Method for Determination of Oxygen Gas Transmission Rate, Permeability and Permeance at Controlled Relative Humidity Through Barrier Materials Using a Coulometric Detector

#### 3. Terminology

3.1 *Definitions*: :

<sup>1</sup> This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee F02 on Flexible Barrier Materials and is the direct responsibility of Subcommittee F02.30 on Test Methods.

Current edition approved May 10, 2002. Published July 2002. Originally published as D 3985 – 81. Last previous edition D 3985 – 95.

<sup>2</sup> For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, [www.astm.org](http://www.astm.org), or contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org). For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

3.1.1 *oxygen permeability coefficient* ( $P'O_2$ )—the product of the permeance and the thickness of film. The permeability is meaningful only for homogeneous materials, in which case it is a property characteristic of the bulk material. This quantity should not be used, unless the relationship between thickness and permeance has been verified on tests using several different thicknesses of the material. The SI unit of oxygen permeability is the mol/m·s·Pa. The test conditions (see 3.1.3) must be stated.

3.1.2 *oxygen permeance* ( $PO_2$ )—the ratio of the  $O_2$ GTR to the difference between the partial pressure of  $O_2$  on the two sides of the film. The SI unit of permeance is the mol/(m<sup>2</sup>·s·Pa). The test conditions (see 5.1) must be stated.

3.1.3 *oxygen transmission rate* ( $O_2$ GTR)—the quantity of oxygen gas passing through a unit area of the parallel surfaces of a plastic film per unit time under the conditions of test. The SI unit of transmission rate is the mol/(m<sup>2</sup>·s). The test conditions, including temperature and oxygen partial pressure on both sides of the film must be stated.

3.1.3.1 A commonly used unit of  $O_2$ GTR is the cm<sup>3</sup>(STP)/m<sup>2</sup>·d at one atmosphere pressure difference where 1 cm<sup>3</sup>(STP) is 44.62 μmol, 1 atm is 0.1013 MPa, and one day is 86.4 × 10<sup>3</sup>s. The  $O_2$ GTR in SI units is obtained by multiplying the value in inch-pound units by 5.160 × 10<sup>-10</sup>.

#### 4. Summary of Test Method

4.1 The oxygen gas transmission rate is determined after the sample has equilibrated in a dry test environment. In this context, a "dry" environment is considered to be one in which the relative humidity is less than 1 %.

4.2 The specimen is mounted as a sealed semi-barrier between two chambers at ambient atmospheric pressure. One chamber is slowly purged by a stream of nitrogen and the other chamber contains oxygen. As oxygen gas permeates through the film into the nitrogen carrier gas, it is transported to the coulometric detector where it produces an electrical current, the magnitude of which is proportional to the amount of oxygen flowing into the detector per unit time.

## 5. Significance and Use

5.1 The  $O_2$ GTR is an important determinant of the packaging protection afforded by barrier materials. It is not, however, the sole determinant, and additional tests, based on experience, must be used to correlate packaging performance with  $O_2$ GTR. It is suitable as a referee method of testing, provided that the purchaser and the seller have agreed on sampling procedures, standardization procedures, test conditions, and acceptance criteria.

5.2 Limited statistical data on correlations with Test Method D 1434 methods are available<sup>3</sup>; however, the oxygen transmission rate of a standard reference material (see 12.1) as determined manometrically by NIST, is in good agreement with the values obtained in the coulometric interlaboratory test using material from the same manufacturing lot. Thus, this test method may be used as a referee method.

## 6. Interferences

6.1 The presence of certain interfering substances in the carrier gas stream may give rise to unwanted electrical outputs and error factors. Interfering substances include free chlorine and some strong oxidizing agents. Exposure to carbon dioxide should also be minimized to avoid damage to the sensor through reaction with the potassium hydroxide electrolyte.

## 7. Apparatus

7.1 *Oxygen Gas Transmission Apparatus*, as diagrammed in Fig. 1 with the following:

<sup>3</sup> Supporting data for this test method can be obtained from ASTM Headquarters. Request RR:D20-1085.

7.1.1 *Diffusion Cell* shall consist of two metal halves, which, when closed upon the test specimen, will accurately define a circular area. The volume enclosed by each cell half, when clamped, is not critical; it should be small enough to allow for rapid gas exchange, but not so small that an unsupported film which happens to sag or bulge will contact the top or bottom of the cell. The diffusion cell shall be provided with a thermometer well for measuring temperature.

7.1.1.1 *O-Ring*—An appropriately sized groove, machined into the oxygen (or test gas) side of the diffusion cell, retains a neoprene O-ring. The test area is considered to be that area established by the inside contact diameter of the compressed O-ring when the diffusion cell is clamped shut against the test specimen. The area,  $A$ , can be obtained by measuring the inside diameter of the imprint left by the O-ring on the specimen after it has been removed from the diffusion cell.

7.1.1.2 The nitrogen (or carrier gas) side of the diffusion cell shall have a flat raised rim. Since this rim is a critical sealing surface against which the test specimen is pressed, it shall be smooth and flat, without radial scratches.

7.1.1.3 *Diffusion Cell Pneumatic Fittings*—The diffusion cell shall incorporate suitable fittings for the introduction and exhaust of gases without significant loss or leakage.

7.1.1.4 It is desirable to thermostatically control the diffusion cell. A simple heating or heating/cooling system regulated to  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ , is adequate for this purpose. A thermistor sensor and an appropriate control circuit will serve to regulate the cell temperature unless measurements are being made close to ambient temperature. In this case, it is desirable to provide cooling capability to remove some of the heat.

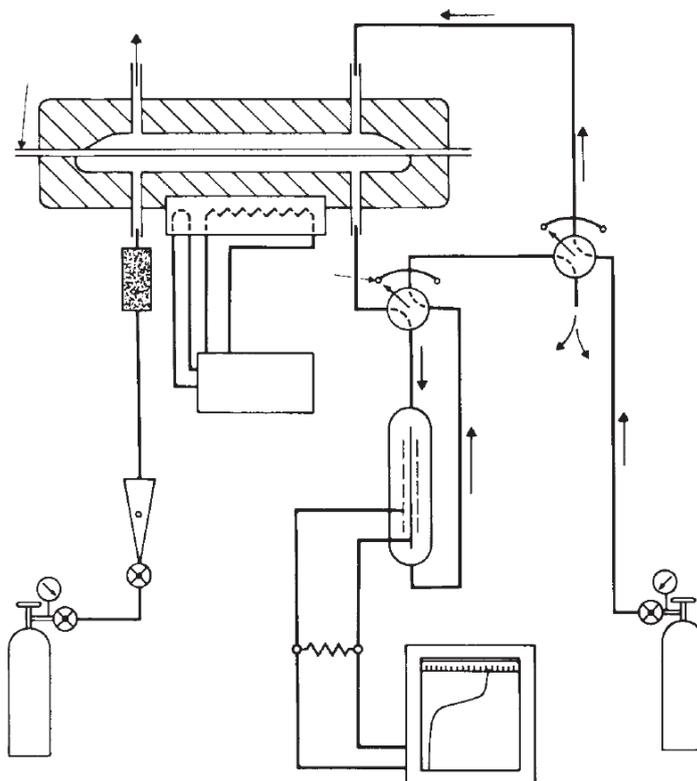


FIG. 1 A Practical Arrangement of Components for the Measurement of Oxygen Transmission Rate Using the Coulometric Method



the extent that efficiency and response are impaired. For that reason, this test method incorporates means for a periodic sensor evaluation. This evaluation is derived from measurements of a known-value “reference package”. Experience indicates however, that a specimen-to-specimen variability of the reference material<sup>7</sup> is such that a change should never be made in the calibration factor, as the result of a measurement using a single sheet of the reference material.

12.3 *Establishing a System Calibration Constant (Used only on systems using a chart recorder to determine O<sub>2</sub>GTR)*—Determine the exposed area, *A*, of the calibrating reference film (see 7.1.1.1). Using the permeance value furnished with the reference film, determine the O<sub>2</sub>GTR through that film of that area (*A*). Use this value to determine the calibration constant, *Q*:

$$Q = \frac{O_2GTR \times R_L}{E_e - E_o} \quad (1)$$

where:

*O<sub>2</sub>GTR* = Oxygen transmission rate through a film of area, *A*, as calculated from data supplied with the reference film,

*R<sub>L</sub>* = value of load resistance,

*E<sub>o</sub>* = observed steady-state zero-level before oxygen gradient is applied, and,

*E<sub>e</sub>* = observed steady-state voltage with oxygen gradient across test film.

Repeat the calibration using additional sheets of the reference film until the confidence interval for *Q* defined by the measurements is within acceptable limits.

### 13. Conditioning

13.1 Trim the test specimen to a size appropriate for the diffusion cell in which it will be mounted. In general, this means that the seal around the edge of the diffusion cell should not be impaired if the specimen bulges or sags slightly. After trimming, condition the specimens in a desiccator over calcium chloride or another suitable desiccator for a minimum of 48 h. This does not imply that 48 h will be sufficient to bring all materials to a condition where their measured O<sub>2</sub>GTRs will be reproducible. Previous experience should serve as the primary guide to the suitability of a given conditioning regimen. If a material is being tested with which the user has no previous experience, the effect of conditioning time should be investigated and a regimen selected such that there is no significant effect due to conditioning time. In any case, the conditioning procedure used should be included in the report section.

13.2 Measure O<sub>2</sub>GTR in a temperature-controlled environment with the apparatus placed in a draft-free location.

### 14. Procedure

14.1 *Preparation of Apparatus*—If preceding tests have exposed the apparatus to high moisture levels, it will be necessary to outgas the system, particularly the catalyst bed, to desorb residual moisture. Water shall be removed from the nitrogen and test gas humidifiers. The system can then be dried

by slowly purging overnight using dry carrier gas and with the sensor bypassed. Heating the apparatus will speed the drying and outgassing process.

14.2 *Inserting the Specimen*—With the sensor bypassed, unclamp the diffusion cell and open it. Apply a thin layer of sealing grease (see 8.3) around the raised rim of the lower half of the diffusion cell. Remove the test specimen from the desiccator and place it upon the greased surface, taking care to avoid wrinkles or creases. Set the movable half of the diffusion cell into place and clamp both halves tightly together.

14.3 *Purging the System*—Place the system in the CARRIER PURGE mode and purge air from the upper and lower diffusion cell chambers, using a flow rate of 50 to 60 mL. After 3 or 4 min, reduce the flow rate to the desired value between 5 and 15 mL/min. Maintain this configuration for 30 min.

14.4 *Establish E<sub>o</sub>*—After the system has been flushed with nitrogen for 30 min, INSERT THE SENSOR so that the carrier gas which has passed through both sides of the diffusion cell is diverted into the sensor.

NOTE 1—*E<sub>o</sub>* often is referred to as “individual zero.”

At this time, the sensor output will usually increase abruptly, indicating that oxygen is entering the sensor with the carrier gas. The most likely sources of this oxygen are (1) outgassing of the sample, (2) leaks in the system, or (3) a combination of (1) and (2). The operator shall observe the recorder trace until the sensor output current stabilizes at a constant value with no significant trend in either direction. Thick samples may require a purge of several hours, or even overnight, before a steady low value of sensor current is obtained. On older systems, the sensor should be bypassed except for brief periods when the zero level is being checked. Once a steady low value of sensor current has been obtained, the sensor may be inserted to monitor the zero level and left there until a stable zero level is obtained. At this time, the zero level is recorded and labelled *E<sub>o</sub>*. It has been found helpful to periodically test the O<sub>2</sub>GTR of a piece of brass shim stock in order to ascertain that no leaks or contamination of the carrier gas have developed.

14.5 Once *E<sub>o</sub>* has been established, switch OXYGEN into the test-gas side of the diffusion cell. This action will be automated on newer systems.

14.6 The sensor output current should increase gradually, ultimately stabilizing at a constant value. While some thin films with high diffusion coefficients may reach equilibrium in 30 to 60 min, thicker or more complex structures may require a number of hours to reach a steady state of gas transmission. The steady-state voltage value of the oxygen transmission rate shall be recorded and labelled *E<sub>e</sub>*.

NOTE 2—If, after attainment of an apparent steady-state condition, any doubt exists as to whether this is a true steady-state condition, perform a check as follows: (1) bypass the sensor; (2) allow the unit to stabilize for an additional period of time (minimum of 6 h); and, (3) insert the sensor again, and monitor the transmission rate. An increased output indicates that steady-state conditions have not been reached, while the same output (no increase) indicates that steady-state conditions have been initially obtained.

14.7 Temperature shall be obtained by monitoring the temperature as close as possible to the specimen.

<sup>7</sup> Reference material available from Mocon Inc., has been found satisfactory.


**D 3985 – 02<sup>e1</sup>**

14.8 *Standby and Shutoff Procedures*—Follow the manufacturer's instructions in the instrument manual for putting the instrument into standby mode when the system will not be used for an extended period.

14.9 *Tests in a Moist Environment*—This test method is for dry (0 RH) conditions only. Specific procedures for testing in a controlled RH environment are covered by Test Method F 1927.

14.10 The O<sub>2</sub>GTR at temperatures other than ambient may be determined by thermostatically controlling the diffusion cell provided that the temperature of the carrier gas does not adversely affect the operation of the sensor. Experience has shown that the unit can be operated satisfactorily in the range from 4 to 65°C.

14.11 *Testing Poor Barriers*—Films having transmission rates in excess of 200 cm<sup>3</sup>(STP)/(m·d) when tested with an oxygen partial pressure difference of one atmosphere are defined as poor barriers. Examples of such materials, depending on thickness, include polyethylene, polycarbonate, and polystyrene. High oxygen concentrations in the carrier gas, from the testing of poor barriers, will tend to produce detector saturation. One way to avoid this problem is to use a test gas that is a mixture with a known concentration of oxygen in nitrogen. The permeance of the film should be calculated using the known value of oxygen partial pressure, and then a transmission rate should be calculated for the appropriate partial pressure difference from the permeance and the desired partial pressure difference. Another way to reduce the oxygen concentration in the carrier gas when testing poor barriers is to mask off most of the area of the test specimen using a mask of thin metal or aluminum foil on both sides of the test specimen by use of a suitable adhesive such as contact cement or epoxy. The specimen area then becomes equal to the open area of the mask. The effect of varying the area of the open hole in the mask should be tested to ensure that the mask is performing properly.

## 15. Calculation

15.1 If using a chart recorder, determine the O<sub>2</sub>GTR as follows:

$$O_2GTR = \frac{(E_e - E_o) \times Q}{A \times R_L} \quad (2)$$

where:

$E_e$  = steady-state voltage level (see 14.6),

$E_o$  = zero voltage level (see 14.4),

$A$  = specimen area (see 7.1.1.1),

$Q$  = calibration constant (see Section 12), and

$R_L$  = value of load resistance (see 7.1.6).

Newer, computer-controlled systems will automatically record the O<sub>2</sub>GTR, and possibly the permeance and permeation coefficient.

15.2 Determine the permeance (PO<sub>2</sub>) of the specimen as follows:

$$PO_2 = \frac{O_2GTR}{p} \quad (3)$$

where  $p$  = partial pressure of oxygen, which is the mol fraction of oxygen multiplied by the total pressure (normally,

one atmosphere), in the test gas side of the diffusion cell. The partial pressure of O<sub>2</sub> on the carrier gas side is considered to be zero.

15.3 Determine the oxygen permeability coefficient (P'O<sub>2</sub>) as follows:

$$P'O_2 = PO_2 \times t \quad (4)$$

where  $t$  = average thickness of the specimen (see 11.2). Results should be expressed as permeabilities only in cases where materials have been determined to be homogeneous by investigation of the relationship between specimen thickness and permeance.

## 16. Report

16.1 Report the following information:

16.1.1 A description of the test specimen, including an identification of the two sides of the material if they are different, a statement as to which side was facing the test gas, the location of the specimen in the lot of material of which it is representative, and the dimensions of the test specimen.

16.1.2 The average thickness of the test specimens as determined in 11.2 and the standard deviation of the thickness values.

16.1.3 The barometric pressure at the time of the test and whether or not barometric pressure compensation is performed on the data, either manually or by computer. Barometric compensation is performed to standardize data to 760 MMHg (sea level).

NOTE 3—The barometric compensation factor may be calculated as follows:

$$fBP_{760} = \frac{BP_{760}}{BP_a} \quad (5)$$

where:

$fBP_{760}$  = barometric compensation factor

$BP_{760}$  = 760 MMHg, and

$BP_a$  = ambient barometric pressure in MMHg.

16.1.4 The partial pressure of the oxygen gas on the test-gas side of the diffusion cell and a statement as to how it was determined.

16.1.5 The rate of flow of the nitrogen carrier gas during the test.

16.1.6 The conditioning procedure used on the test specimens prior to testing.

16.1.7 The temperature of the test specimen (to the nearest 0.5°C) and the method used to determine the temperature.

16.1.8 The values of O<sub>2</sub>GTR, permeance (if desired), and the permeability (if desired).

16.1.9 A description of the apparatus used including, if applicable, the manufacturer's model number and serial number.

16.1.10 The calibration factor ( $Q$ ) and a statement of the means used to obtain the calibration factor (only needed if a voltage recorder is being used to calculate O<sub>2</sub>GTR).

16.1.11 The effective area for permeation,  $A$ , and a description of how it was obtained.

16.1.12 The time to reach steady-state after introduction of the oxygen gas into the test-gas side of the diffusion cell.



## 17. Precision and Bias

17.1 The data given were obtained at a temperature of 20 to 25°C from statistical analysis of an interlaboratory test program in which sheets of a polyester film nominally 23  $\mu\text{m}$  thick were distributed to 17 participants.<sup>3</sup> The participants used two different models of a commercially available coulometric gas transmission measuring instrument, corrected the data for atmospheric pressure and temperature fluctuations, and reported permeance values. No significant difference was found between results obtained from the two models, and the results from the two models were pooled.

17.2 *Variability*—The statistical analysis of the data took the unequal number of replicates from each respondent into account. The between-laboratory standard deviation,  $S_b$ , is 5.0  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$ , and within-laboratory standard deviation,  $S_w$ , is 1.2  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$ . The standard deviation for the uncertainty of a single measurement is, therefore, 5.1  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$ .

17.3 A weighted average material value,  $X$ , and its standard error were calculated from the data, taking the within- and between-laboratory variability into account. The weighted average material value was found to be 59.36  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$  and the standard error of 1.21  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$ .

17.4 The material used in the interlaboratory test was from the same manufacturing lot as NIST Standard Reference Material 1470, which NIST has found to possess an  $\text{O}_2$ GTR equal, at a pressure differential of one atmosphere (0.10133 MPa), to 63.8  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$  with a standard error of 0.4  $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{atm})$ . This discrepancy may be attributable to differences in sampling, test methodology, or analysis of the data.

## 18. Keywords

18.1 coulometric; oxygen transmission rate; permeability; permeation; plastic films

*ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.*

*This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.*

*This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-9585 (phone), 610-832-9555 (fax), or service@astm.org (e-mail); or through the ASTM website (www.astm.org).*



Designation: D 882 – 02

## Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting<sup>1</sup>

This standard is issued under the fixed designation D 882; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

*These test methods have been approved for use by agencies of the Department of Defense to replace Method 1013 of Federal Test Method Standard 406.*

### 1. Scope \*

1.1 This test method covers the determination of tensile properties of plastics in the form of thin sheeting, including film (less than 1.0 mm (0.04 in.) in thickness).

NOTE 1—Film has been arbitrarily defined as sheeting having nominal thickness not greater than 0.25 mm (0.010 in.).

NOTE 2—Tensile properties of plastics 1.0 mm (0.04 in.) or greater in thickness shall be determined according to Test Method D 638.

1.2 This test method may be used to test all plastics within the thickness range described and the capacity of the machine employed.

1.2.1 *Static Weighing, Constant-Rate-of-Grip Separation Test*—This test method employs a constant rate of separation of the grips holding the ends of the test specimen.

1.3 Specimen extension may be measured in these test methods by grip separation, extension indicators, or displacement of gage marks.

1.4 A procedure for determining the tensile modulus of elasticity is included at one strain rate.

NOTE 3—The modulus determination is generally based on the use of grip separation as a measure of extension; however, the desirability of using extensometers, as described in 5.2, is recognized and provision for the use of such instrumentation is incorporated in the procedure.

1.5 Test data obtained by this test method is relevant and appropriate for use in engineering design.

1.6 The values stated in SI units are to be regarded as the standard. The values in parentheses are provided for information only.

1.7 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.*

NOTE 4—This test method is similar to ISO 527-3, but is not considered

<sup>1</sup> These test methods are under the jurisdiction of ASTM Committee D20 on Plastics and are the direct responsibility of Subcommittee D20.10 on Mechanical Properties.

Current edition approved April 10, 2002. Published June 2002. Originally published as D 882 – 46 T. Last previous edition D 882 – 01.

technically equivalent. ISO 527-3 allows for additional specimen configurations, specifies different test speeds, and requires an extensometer or gage marks on the specimen.

### 2. Referenced Documents

#### 2.1 ASTM Standards:

D 618 Practice for Conditioning Plastics for Testing<sup>2</sup>

D 638 Test Method for Tensile Properties of Plastics<sup>2</sup>

D 4000 Classification System for Specifying Plastic Materials<sup>3</sup>

D 5947 Test Methods for Physical Dimensions of Solid Plastic Specimens<sup>4</sup>

D 6287 Practice for Cutting Film and Sheeting Test Specimens<sup>4</sup>

E 4 Practices for Force Verification of Testing Machines<sup>5</sup>

E 691 Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method<sup>6</sup>

#### 2.2 ISO Standard:

ISO 527-3 Plastics—Determination of Tensile Properties—Part 3: Test Conditions for Films and Sheets<sup>7</sup>

### 3. Terminology

3.1 *Definitions*—Definitions of terms and symbols relating to tension testing of plastics appear in the Annex to Test Method D 638.

3.1.1 *line grips*—grips having faces designed to concentrate the entire gripping force along a single line perpendicular to the direction of testing stress. This is usually done by combining one standard flat face and an opposing face from which protrudes a half-round.

3.1.2 *tear failure*—a tensile failure characterized by fracture initiating at one edge of the specimen and progressing across the specimen at a rate slow enough to produce an anomalous load-deformation curve.

<sup>2</sup> Annual Book of ASTM Standards, Vol 08.01.

<sup>3</sup> Annual Book of ASTM Standards, Vol 08.02.

<sup>4</sup> Annual Book of ASTM Standards, Vol 08.03.

<sup>5</sup> Annual Book of ASTM Standards, Vol 03.01.

<sup>6</sup> Annual Book of ASTM Standards, Vol 14.02.

<sup>7</sup> Available from American National Standards Institute, 25 W. 43rd St., 4th Floor, New York, NY 10036.

\*A Summary of Changes section appears at the end of this standard.



#### 4. Significance and Use

4.1 Tensile properties determined by this test method are of value for the identification and characterization of materials for control and specification purposes. Tensile properties may vary with specimen thickness, method of preparation, speed of testing, type of grips used, and manner of measuring extension. Consequently, where precise comparative results are desired, these factors must be carefully controlled. This test method shall be used for referee purposes, unless otherwise indicated in particular material specifications. For many materials, there may be a specification that requires the use of this test method, but with some procedural modifications that take precedence when adhering to the specification. Therefore, it is advisable to refer to that material specification before using this test method. Table 1 in Classification D 4000 lists the ASTM materials standards that currently exist.

4.2 Tensile properties may be utilized to provide data for research and development and engineering design as well as quality control and specification. However, data from such tests cannot be considered significant for applications differing widely from the load-time scale of the test employed.

4.3 The tensile modulus of elasticity is an index of the stiffness of thin plastic sheeting. The reproducibility of test results is good when precise control is maintained over all test conditions. When different materials are being compared for stiffness, specimens of identical dimensions must be employed.

4.4 The tensile energy to break (TEB) is the total energy absorbed per unit volume of the specimen up to the point of rupture. In some texts this property has been referred to as *toughness*. It is used to evaluate materials that may be subjected to heavy abuse or that might stall web transport equipment in the event of a machine malfunction in end-use applications. However, the rate of strain, specimen parameters, and especially flaws may cause large variations in the results. In that sense, caution is advised in utilizing TEB test results for end-use design applications.

4.5 Materials that fail by tearing give anomalous data which cannot be compared with those from normal failure.

#### 5. Apparatus

5.1 *Testing Machine*—A testing machine of the constant rate-of-crosshead-movement type and comprising essentially the following:

5.1.1 *Fixed Member*—A fixed or essentially stationary member carrying one grip.

5.1.2 *Movable Member*—A movable member carrying a second grip.

5.1.3 *Grips*—A set of grips for holding the test specimen between the fixed member and the movable member of the testing machine; grips can be either the fixed or self-aligning type. In either case, the gripping system must minimize both slippage and uneven stress distribution.

5.1.3.1 *Fixed grips* are rigidly attached to the fixed and movable members of the testing machine. When this type of grip is used, care must be taken to ensure that the test specimen is inserted and clamped so that the long axis of the test specimen coincides with the direction of pull through the center line of the grip assembly.

5.1.3.2 *Self-aligning grips* are attached to the fixed and movable members of the testing machine in such a manner that they will move freely into alignment as soon as a load is applied so that the long axis of the test specimen will coincide with the direction of the applied pull through the center line of the grip assembly. The specimens should be aligned as perfectly as possible with the direction of pull so that no rotary motion that may induce slippage will occur in the grips; there is a limit to the amount of misalignment self-aligning grips will accommodate.

5.1.3.3 The test specimen shall be held in such a way that slippage relative to the grips is prevented insofar as possible. Grips lined with thin rubber, crocus-cloth, or pressure-sensitive tape as well as file-faced or serrated grips have been successfully used for many materials. The choice of grip surface will depend on the material tested, thickness, etc. Line grips padded on the round face with 1.0 mm (40 mil) blotting paper or filter paper have been found superior. Air-actuated grips have been found advantageous, particularly in the case of materials that tend to “neck” into the grips, since pressure is maintained at all times. In cases where samples frequently fail at the edge of the grips, it may be advantageous to increase slightly the radius of curvature of the edges where the grips come in contact with the test area of the specimen.

5.1.4 *Drive Mechanism*—A drive mechanism for imparting to the movable member a uniform, controlled velocity with respect to the stationary member. The velocity shall be regulated as specified in Section 9.

5.1.5 *Load Indicator*—A suitable load-indicating mechanism capable of showing the total tensile load carried by the test specimen held by the grips. This mechanism shall be essentially free of inertial lag at the specified rate of testing (see Note 5). Unless a suitable extensometer is used (see 5.2), the motion of the weighing system shall not exceed 2 % of the specimen extension within the range being measured. The load indicator shall determine the tensile load applied to the specimen with an accuracy of  $\pm 1$  % of the indicated value, or better. The accuracy of the testing machine shall be verified in accordance with Practices E 4.

5.1.6 *Crosshead Extension Indicator*—A suitable extension-indicating mechanism capable of showing the amount of change in the separation of the grips, that is, crosshead movement. This mechanism shall be essentially free of inertial lag at the specified rate of testing (see Note 5) and shall indicate the crosshead movement with an accuracy of  $\pm 1$  % of the indicated value, or better.

5.2 *Extensometer (Optional)*—A suitable instrument may, if desired, be used for determining the distance between two designated points on the test specimen as the specimen is stretched. This apparatus, if employed, shall be so designed as to minimize stress on the specimen at the contact points of the specimen and the instrument (see 8.3). It is desirable that this instrument automatically record the distance, or any change in it, as a function of the load on the test specimen or of the elapsed time from the start of the test, or both. If only the latter is obtained, load-time data must also be taken. This instrument must be essentially free of inertial lag at the specified speed of testing (see Note 5).



**5.2.1 Modulus of Elasticity and Low-Extension Measurements**—Extensometers used for modulus of elasticity and low-extension (less than 20 % elongation) measurements shall, at a minimum, be accurate to  $\pm 1\%$  and comply with the requirements set forth in Practice E 83 for a Class C instrument.

**5.2.2 High-Extension Measurements**—Instrumentation and measuring techniques used for high-extension (20 % elongation or greater) measurements shall be accurate to  $\pm 10\%$  of the indicated value, or better.

**NOTE 5**—A sufficiently high response speed in the indicating and recording system for the load and extension data is essential. The response speed required of the system will depend in part on the material tested (high or low elongation) and the rate of straining.

**5.3 Thickness Gage**—A dead-weight dial micrometer as prescribed in Method C of Test Methods D 5947, or an equivalent measuring device, reading to 0.0025 mm (0.0001 in.) or less.

**5.4 Width-Measuring Devices**—Suitable test scales or other width measuring devices capable of measuring 0.25 mm (0.010 in.) or less.

**5.5 Specimen Cutter**—For the apparatus and techniques for cutting film and sheeting used in this test method, refer to Practice D 6287.

**5.5.1** Devices that use razor blades have proven especially suitable for materials having an elongation-at-fracture above 10 to 20 %.

**5.5.2** The use of punch press or striking dies are not recommended because poor and inconsistent specimen edges may be produced.

## 6. Test Specimens

**6.1** The test specimens shall consist of strips of uniform width and thickness at least 50 mm (2 in.) longer than the grip separation used.

**6.2** The nominal width of the specimens shall be not less than 5.0 mm (0.20 in.) or greater than 25.4 mm (1.0 in.).

**6.3** A width-thickness ratio of at least eight shall be used. Narrow specimens magnify effects of edge strains or flaws, or both.

**6.4** The utmost care shall be exercised in cutting specimens to prevent nicks and tears which are likely to cause premature failures (Note 6). The edges shall be parallel to within 5 % of the width over the length of the specimen between the grips.

**NOTE 6**—Microscopical examination of specimens may be used to detect flaws due to sample or specimen preparation.

**6.5** Wherever possible, the test specimens shall be selected so that thickness is uniform to within 10 % of the thickness over the length of the specimen between the grips in the case of materials 0.25 mm (0.010 in.) or less in thickness and to within 5 % in the case of materials greater than 0.25 mm (0.010 in.) in thickness but less than 1.00 mm (0.040 in.) in thickness.

**NOTE 7**—In cases where thickness variations are in excess of those recommended in 6.5, results may not be characteristic of the material under test.

**6.6** If the material is suspected of being anisotropic, two sets of test specimens shall be prepared having their long axes respectively parallel with and normal to the suspected direction of anisotropy.

**6.7** For tensile modulus of elasticity determinations, a specimen gage length of 250 mm (10 in.) shall be considered as standard. This length is used in order to minimize the effects of grip slippage on test results. When this length is not feasible, test sections as short as 100 mm (4 in.) may be used if it has been shown that results are not appreciably affected. However, the 250-mm gage length shall be used for referee purposes. The speed of testing of shorter specimens must be adjusted in order for the strain rate to be equivalent to that of the standard specimen.

**NOTE 8**—Two round robin tests<sup>8</sup> have shown that, for materials of less than 0.25-mm (10-mil) thickness, line grips padded on the round side with 1.0-mm (40-mil) blotting paper give the same results with a 100-mm test section as a 250-mm test section produces with flat-face grips.

**NOTE 9**—Excessive jaw slippage becomes increasingly difficult to overcome in cases where high modulus materials are tested in thicknesses greater than 0.25 mm (0.010 in.).

## 7. Conditioning

**7.1 Conditioning**—Condition the test specimens at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $73.4 \pm 3.6^\circ\text{F}$ ) and  $50 \pm 5\%$  relative humidity for not less than 40 h prior to test in accordance with Procedure A of Practice D 618 unless otherwise specified by contract or the relevant ASTM material specification. Reference pre-test conditioning, to settle disagreements, shall apply tolerances of  $\pm 1^\circ\text{C}$  ( $1.8^\circ\text{F}$ ) and  $\pm 2\%$  relative humidity.

**7.2 Test Conditions**—Conduct the tests at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  ( $73.4 \pm 3.6^\circ\text{F}$ ) and  $50 \pm 5\%$  relative humidity unless otherwise specified by contract or the relevant ASTM material specification. Reference testing conditions, to settle disagreements, shall apply tolerances of  $\pm 1^\circ\text{C}$  ( $1.8^\circ\text{F}$ ) and  $\pm 2\%$  relative humidity.

## 8. Number of Test Specimens

**8.1** In the case of isotropic materials, at least five specimens shall be tested from each sample.

**8.2** In the case of anisotropic materials, at least ten specimens, five normal and five parallel with the principal axis of anisotropy, shall be tested from each sample.

**8.3** Specimens that fail at some obvious flaw or that fail outside the gage length shall be discarded and retests made, unless such flaws or conditions constitute a variable whose effect is being studied. However, jaw breaks (failures at the grip contact point) are acceptable if it has been shown that results from such tests are in essential agreement with values obtained from breaks occurring within the gage length.

**NOTE 10**—In the case of some materials, examination of specimens, prior to and following testing, under crossed optical polarizers (polarizing films) provides a useful means of detecting flaws which may be, or are, responsible for premature failure.

<sup>8</sup> Supporting data are available from ASTM Headquarters. Request RR: D20-1058.



## 9. Speed of Testing

9.1 The speed of testing is the rate of separation of the two members (or grips) of the testing machine when running idle (under no load). This rate of separation shall be maintained within 5 % of the no-load value when running under full-capacity load.

9.2 The speed of testing shall be calculated from the required initial strain rate as specified in Table 1. The rate of grip separation may be determined for the purpose of these test methods from the initial strain rate as follows:

$$A = BC \quad (1)$$

where:

- $A$  = rate of grip separation, mm (or in.)/min,
- $B$  = initial distance between grips, mm (or in.), and
- $C$  = initial strain rate, mm/mm·min (or in./in.·min).

9.3 The initial strain rate shall be as in Table 1 unless otherwise indicated by the specification for the material being tested.

NOTE 11—Results obtained at different initial strain rates are not comparable; consequently, where direct comparisons between materials in various elongation classes are required, a single initial strain rate should be used. For some materials it may be advisable to select the strain rates on the basis of percent elongation at yield.

9.4 In cases where conflicting material classification, as determined by percent elongation at break values, results in a choice of strain rates, the lower rate shall be used.

9.5 If modulus values are being determined, separate specimens shall be used whenever strain rates and specimen dimensions are not the same as those employed in the test for other tensile properties.

## 10. Procedure

10.1 Select a load range such that specimen failure occurs within its upper two thirds. A few trial runs may be necessary to select a proper combination of load range and specimen width.

10.2 Measure the cross-sectional area of the specimen at several points along its length. Measure the width to an accuracy of 0.25 mm (0.010 in.) or better. Measure the thickness to an accuracy of 0.0025 mm (0.0001 in.) or better for films less than 0.25 mm (0.010 in.) in thickness and to an accuracy of 1 % or better for films greater than 0.25 mm (0.010 in.) but less than 1.0 mm (0.040 in.) in thickness.

10.3 Set the initial grip separation in accordance with Table 1.

10.4 Set the rate of grip separation to give the desired strain rate, based on the initial distance between the grips, in

accordance with Table 1. Zero the calibrated load weighing system, extension indicator(s) and recording system.

NOTE 12—Extensometers may be used for modulus of elasticity determinations with the expectation of obtaining more accurate values than may be obtained using grip separation as the effective gage length. Precautions should be taken to ensure that extensometer slippage and undue stressing of the specimen do not occur. Refer also to 6.7.

10.5 In cases where it is desired to measure a test section other than the total length between the grips, mark the ends of the desired test section with a soft, fine wax crayon or with ink. Do not scratch these marks onto the surface since such scratches may act as stress raisers and cause premature specimen failure. Extensometers may be used if available; in this case, the test section will be defined by the contact points of the extensometer.

NOTE 13—Measurement of a specific test section is necessary with some materials having high elongation. As the specimen elongates, the accompanying reduction in area results in a loosening of material at the inside edge of the grips. This reduction and loosening moves back into the grips as further elongation and reduction in area takes place. In effect, this causes problems similar to grip slippage, that is, exaggerates measured extension.

10.6 Place the test specimen in the grips of the testing machine, taking care to align the long axis of the specimen with an imaginary line joining the points of attachment of the grips to the machine. Tighten the grips evenly and firmly to the degree necessary to minimize slipping of the specimen during test.

10.7 Start the machine and record load versus extension.

10.7.1 When the total length between the grips is used as the test area, record load versus grip separation.

10.7.2 When a specific test area has been marked on the specimen, follow the displacement of the edge boundary lines with respect to each other with dividers or some other suitable device. If a load-extension curve is desired, plot various extensions versus corresponding loads sustained, as measured by the load indicator.

10.7.3 When an extensometer is used, record load versus extension of the test area measured by the extensometer.

10.8 If modulus values are being determined, select a load range and chart rate to produce a load-extension curve of between 30 and 60° to the  $X$  axis. For maximum accuracy, use the most sensitive load scale for which this condition can be met. The test may be discontinued when the load-extension curve deviates from linearity.

10.9 In the case of materials being evaluated for secant modulus, the test may be discontinued when the specified extension has been reached.

TABLE 1 Crosshead Speeds and Initial Grip Separation

Percent Elongation at Break	Initial Strain Rate, mm/mm·min (in./in.·min)	Initial Grip Separation		Rate of Grip Separation	
		mm	in.	mm/min	in./min
Modulus of Elasticity Determination					
	0.1	250	10	25	1.0
Determinations other than Elastic Modulus					
Less than 20	0.1	125	5	12.5	0.5
20 to 100	0.5	100	4	50	2.0
Greater than 100	10.0	50	2	500	20.0



10.10 If tensile energy to break is being determined, some provision must be made for integration of the stress-strain curve. This may be either an electronic integration during the test or a subsequent determination from the area of the finished stress-strain curve (see Annex A2).

## 11. Calculation

11.1 Toe compensation shall be made in accordance with Annex A1 unless it can be shown that the toe region of the curve is not due to the take-up of slack, seating of the specimen, or other artifact, but rather is an authentic material response.

11.2 *Breaking Factor* (nominal) shall be calculated by dividing the maximum load by the original minimum width of the specimen. The result shall be expressed in force per unit of width, usually newtons per metre (or pounds per inch) of width, and reported to three significant figures. The thickness of the film shall always be stated to the nearest 0.0025 mm (0.0001 in.).

*Example*—Breaking Factor = 1.75 kN/m (10.0 lbf/in.) of width for 0.1300-mm (0.0051-in.) thickness.

NOTE 14—This method of reporting is useful for very thin films (0.13 mm (0.005 in.) and less) for which breaking load may not be proportional to cross-sectional area and whose thickness may be difficult to determine with precision. Furthermore, films which are in effect laminar due to orientation, skin effects, nonuniform crystallinity, etc., have tensile properties disproportionate to cross-sectional area.

11.3 *Tensile Strength* (nominal) shall be calculated by dividing the maximum load by the original minimum cross-sectional area of the specimen. The result shall be expressed in force per unit area, usually megapascals (or pounds-force per square inch). This value shall be reported to three significant figures.

NOTE 15—When tear failure occurs, so indicate and calculate results based on load and elongation at which tear initiates, as reflected in the load-deformation curve.

11.4 *Tensile Strength at Break* (nominal) shall be calculated in the same way as the tensile strength except that the load at break shall be used in place of the maximum load (Note 15 and Note 16).

NOTE 16—In many cases tensile strength and tensile strength at break are identical.

11.5 *Percent Elongation at Break* shall be calculated by dividing the extension at the moment of rupture of the specimen by the initial gage length of the specimen and multiplying by 100. When gage marks or extensometers are used to define a specific test section, only this length shall be used in the calculation; otherwise the distance between the grips shall be used. The result shall be expressed in percent and reported to two significant figures (Note 15).

11.6 *Yield Strength*, where applicable, shall be calculated by dividing the load at the yield point by the original minimum cross-sectional area of the specimen. The result shall be expressed in force per unit area, usually megapascals (or pounds-force per square inch). This value shall be reported to three significant figures. Alternatively, for materials that exhibit Hookean behavior in the initial part of the curve, an offset yield strength may be obtained as described in the Appendix of Test

Method D 638. In this case the value should be given as “yield strength at —% offset.”

11.7 *Percent Elongation at Yield*, where applicable, shall be calculated by dividing the extension at the yield point by the initial gage length of specimen and multiplying by 100. When gage marks or extensometers are used to define a specific test section, only this length shall be used in the calculation. Before calculating, correct the extension for “toe compensation” as described in Annex A1. The results shall be expressed in percent and reported to two significant figures. When offset yield strength is used, the elongation at the offset yield strength may be calculated.

11.8 *Elastic Modulus* shall be calculated by drawing a tangent to the initial linear portion of the load-extension curve, selecting any point on this tangent, and dividing the tensile stress by the corresponding strain. Before calculating, correct the extension for “toe compensation” as described in Annex A1. For purposes of this determination, the tensile stress shall be calculated by dividing the load by the average original cross section of the test section. The result shall be expressed in force per unit area, usually megapascals (or pounds-force per square inch), and reported to three significant figures.

11.9 *Secant Modulus*, at a designated strain, shall be calculated by dividing the corresponding stress (nominal) by the designated strain. Elastic modulus values are preferable and shall be calculated whenever possible. However, for materials where no proportionality is evident, the secant value shall be calculated. Draw the tangent as directed in A1.3 and Fig. A1.2 of Annex A1, and mark off the designated strain from the yield point where the tangent line goes through zero stress. The stress to be used in the calculation is then determined by dividing the load at the designated strain on the load-extension curve by the original average cross-sectional area of the specimen.

11.10 *Tensile Energy to Break*, where applicable, shall be calculated by integrating the energy per unit volume under the stress-strain curve or by integrating the total energy absorbed and dividing it by the volume of the original gage region of the specimen. As indicated in Annex A2, this may be done directly during the test by an electronic integrator, or subsequently by computation from the area of the plotted curve. The result shall be expressed in energy per unit volume, usually in megajoules per cubic metre (or inch-pounds-force per cubic inch). This value shall be reported to two significant figures.

11.11 For each series of tests, the arithmetic mean of all values obtained shall be calculated to the proper number of significant figures.

11.12 The standard deviation (estimated) shall be calculated as follows and reported to two significant figures:

$$s = \sqrt{(\sum X^2 - n\bar{X}^2)/(n - 1)} \quad (2)$$

where:

- $s$  = estimated standard deviation,
- $X$  = value of a single observation,
- $n$  = number of observations, and
- $\bar{X}$  = arithmetic mean of the set of observations.

## 12. Report

12.1 Report the following information:



D 882

12.1.1 Complete identification of the material tested, including type, source, manufacturer's code number, form, principal dimensions, previous history, and orientation of samples with respect to anisotropy (if any),

12.1.2 Method of preparing test specimens,

12.1.3 Thickness, width, and length of test specimens,

12.1.4 Number of specimens tested,

12.1.5 Strain rate employed,

12.1.6 Grip separation (initial),

ments were taken by five laboratories. The relative precision obtained in this interlaboratory study is in Table 2.

13.1.1 In deriving the estimates in Table 2, statistical outliers were not removed, in keeping with Practice E 691.<sup>9</sup>

13.1.2 The within-lab standard deviation of a mean value,  $S_{\bar{x}}$ , in each case was determined from the standard deviation,  $S_{\bar{x}}$ , of the five individual specimens as follows:  $S_{\bar{x}} = S_x / (5)^{1/2}$ . The  $S_{\bar{x}}$  values were pooled among laboratories for a given material to obtain the within-lab standard deviation,  $S_r$ , of a

TABLE 2 Precision Data for Modulus

Tangent Modulus						
Material	Thickness, mils	Average, $10^3$ psi	$S_r$ , $10^3$ psi	$S_{Rr}$ , $10^3$ psi	$I_r$ , $10^3$ psi	$I_{Rr}$ , $10^3$ psi
LDPE	1.4	53.9	1.81	8.81	5.12	24.9
HDPE	1.6	191	5.47	16.2	15.5	45.9
PP	1.1	425	10.3	31.5	29.0	89.1
PET	0.9	672	13.8	55.5	39.1	157.1
Secant Modulus						
LDPE	1.4	45.0	2.11	3.43	5.98	9.70
HDPE	1.6	150	3.29	9.58	9.30	27.1
PP	1.1	372	4.66	26.5	13.2	74.9
PET	0.9	640	10.0	27.5	28.4	77.8

12.1.7 Crosshead speed (rate of grip separation),

12.1.8 Gage length (if different from grip separation),

12.1.9 Type of grips used, including facing (if any),

12.1.10 Conditioning procedure (test conditions, temperature, and relative humidity if nonstandard),

12.1.11 Anomalous behavior such as tear failure and failure at a grip,

12.1.12 Average breaking factor and standard deviation,

12.1.13 Average tensile strength (nominal) and standard deviation,

12.1.14 Average tensile strength at break (nominal) and standard deviation,

12.1.15 Average percent elongation at break and standard deviation,

12.1.16 Where applicable, average tensile energy to break and standard deviation,

12.1.17 In the case of materials exhibiting "yield" phenomenon: average yield strength and standard deviation; and average percent elongation at yield and standard deviation,

12.1.18 For materials which do not exhibit a yield point: average —% offset yield strength and standard deviation; and average percent elongation at —% offset yield strength and standard deviation,

12.1.19 Average modulus of elasticity and standard deviation (if secant modulus is used, so indicate and report strain at which calculated), and

12.1.20 When an extensometer is employed, so indicate.

### 13. Precision and Bias

13.1 Two interlaboratory tests have been run for these tensile properties. The first was run for modulus only, in 1977, in which randomly drawn samples of four thin ( $\sim 0.025$  mm (0.001-in.)) materials were tested with five specimens in each laboratory. Elastic (tangent) modulus measurements were made by six laboratories, and secant (1 %) modulus measure-

test result (mean of five specimens). See 13.3-13.3.2 for definitions of terms in the tables.

13.2 An interlaboratory test was run for all the other tensile properties except modulus in 1981, in which randomly drawn samples of six materials (one of these in three thicknesses) ranging in thickness from 0.019 to 0.178 mm (0.00075 to 0.007 in.) were tested in seven laboratories. A test result was defined as the mean of five specimen determinations. However, each laboratory tested eight specimens, and the  $S_{\bar{x}}$  was determined from  $S_{\bar{x}} = S_x / (5)^{1/2}$  as above. This was done to improve the quality of the statistics while maintaining their applicability to a five-specimen test result. The materials and their thicknesses are identified in Tables 3-7, each of which contain data for one of the following properties: tensile yield stress, yield elongation, tensile strength, tensile elongation at break, and tensile energy at break (see Note 17).<sup>10</sup>

NOTE 17—Subsequent to filing the research report, examination of the LDPE used in this study between crossed polarizers revealed lengthwise lines representing substantial widthwise variation in molecular orientation that probably was not successfully randomized out of the between-labs component of variance.

NOTE 18—**Caution:** The following explanations of  $I_r$  and  $I_{Rr}$  (13.3-13.3.3) are only intended to present a meaningful way of considering the *Approximate* precision of this test method. The data in Table 2 should not be rigorously applied to the acceptance or rejection of material, as those data are specific to the round robin and may not be representative of other lots, conditions, materials, or laboratories. Users of this test method should apply the principles outlined in Practice E 691 to generate data specific to their laboratory and materials, or between specific laboratories. The principles of 13.3-13.3.3 would then be valid for such data.

<sup>9</sup> Supporting data are available from ASTM Headquarters. Request RR: D20-1084.

<sup>10</sup> Supporting data are available from ASTM Headquarters. Request RR: D20-1101.



TABLE 3 Precision Data for Yield Stress

Material	Thickness, mils	Average, 10 <sup>3</sup> psi	(S <sub>r</sub> ) <sup>A</sup> 10 <sup>3</sup> psi	(S <sub>R</sub> ) <sup>B</sup> 10 <sup>3</sup> psi	l(r) <sup>C</sup> 10 <sup>3</sup> psi	l(R) <sup>D</sup> 10 <sup>3</sup> psi
LDPE	1.0	1.49	0.051	0.13	0.14	0.37
HDPE	1.0	4.33	0.084	0.16	0.24	0.44
PP	0.75	6.40	0.13	0.52	0.37	1.46
PC	4.0	8.59	0.072	0.29	0.20	0.82
CTA	5.3	11.4	0.12	0.50	0.34	1.43
PET	4.0	14.3	0.12	0.23	0.34	0.66
PET	2.5	14.4	0.14	0.54	0.40	1.52
PET	7.0	14.4	0.13	0.36	0.37	1.03

<sup>A</sup> S<sub>r</sub> is the within-laboratory standard deviation of the average.

<sup>B</sup> S<sub>R</sub> is the between-laboratories standard deviation of the average.

<sup>C</sup> l<sub>r</sub> = 2.83 S<sub>r</sub>.

<sup>D</sup> l<sub>R</sub> = 2.83 S<sub>R</sub>.

TABLE 4 Precision Data for Yield Elongation

Material	Thickness, mils	Average, %	(S <sub>r</sub> ) <sup>A</sup> , %	(S <sub>R</sub> ) <sup>B</sup> , %	l(r) <sup>C</sup> , %	l(R) <sup>D</sup> , %
PP	0.75	3.5	0.15	0.41	0.42	1.2
PET	2.5	5.2	0.26	0.92	0.74	2.6
PET	4.0	5.3	0.25	0.60	0.71	1.7
PET	7.0	5.4	0.14	1.05	0.40	3.0
CTA	5.3	5.4	0.19	0.99	0.54	2.8
PC	4.0	6.9	0.24	0.98	0.68	2.8
HDPE	1.0	8.8	0.32	1.82	0.91	5.2
LDPE	1.0	10.0	0.55	3.41	1.56	9.6

NOTE 1—See Table 3 for footnote explanation.

TABLE 5 Precision Data for Tensile Strength

Material	Thickness, mils	Average, 10 <sup>3</sup> psi	(S <sub>r</sub> ) <sup>A</sup> 10 <sup>3</sup> psi	(S <sub>R</sub> ) <sup>B</sup> 10 <sup>3</sup> psi	l(r) <sup>C</sup> 10 <sup>3</sup> psi	l(R) <sup>D</sup> 10 <sup>3</sup> psi
LDPE	1.0	3.42	0.14	0.53	0.40	1.5
HDPE	1.0	6.87	0.27	0.81	0.76	2.3
PC	4.0	12.0	0.34	0.93	0.96	2.6
CTA	5.3	14.6	0.20	1.37	0.57	3.9
PP	0.75	28.4	1.57	4.56	4.4	12.9
PET	4.0	28.9	0.65	1.27	1.8	3.6
PET	7.0	30.3	0.83	1.32	2.3	3.7
PET	2.5	30.6	1.22	2.64	3.4	7.5

NOTE 1—See Table 3 for footnote explanation.

TABLE 6 Precision Data for Elongation at Break

Material	Thickness, mils	Average, %	(S <sub>r</sub> ) <sup>A</sup> , %	(S <sub>R</sub> ) <sup>B</sup> , %	l(r) <sup>C</sup> , %	l(R) <sup>D</sup> , %
CTA	5.3	26.4	1.0	4.3	3	12
PP	0.75	57.8	4.4	12.7	12	36
PET	2.5	120	8.0	14.6	23	41
PET	7.0	132	5.8	10.6	16	30
PET	4.0	134	4.4	12.2	12	35
PC	4.0	155	5.4	17.1	15	48
LDPE	1.0	205	24.4	73.3	69	210
HDPE	1.0	570	26.0	91.7	74	260

NOTE 1—See Table 3 for footnote explanation.

13.3 For the purpose of compiling summary statistics, a test result has been defined to be the average of five replicate measurements of a property for a material in a laboratory, as specified in this test method. Summary statistics are given in Table 3. In each table, for the material indicated, S(r) is the pooled within-laboratory standard deviation of a test result, S(R) is the between-laboratory standard deviation of a test result, where r equals 2.83 × S(r) (see 13.3.1) and R equals 2.83 × S(R) (see 13.3.2).

13.3.1 *Repeatability, I<sub>r</sub>* (Comparing two test results for the same material, obtained by the same operator using the same equipment on the same day)—The two test results should be judged not equivalent if they differ by more than the I<sub>r</sub> value for that material.

13.3.2 *Reproducibility*—In comparing two mean values for the same material obtained by different operators using different equipment on different days, either in the same



TABLE 7 Precision Data for Tensile Energy to Break

Material	Thickness, mils	Average, $10^3$ in./lb./in. <sup>3</sup>	$(S_T)^A 10^3$ in./lb./in. <sup>3</sup>	$(S_R)^B 10^3$ in./lb./in. <sup>3</sup>	$I(r)^C 10^3$ in./lb./in. <sup>3</sup>	$I(R)^D 10^3$ in./lb./in. <sup>3</sup>
CTA	5.0	3.14	0.14	0.70	0.4	2.0
LDPE	1.0	5.55	0.84	2.47	2.4	7.0
PP	0.75	11.3	1.19	3.11	3.4	8.8
PC	4.0	12.9	0.59	1.55	1.7	4.4
HDPE	1.0	26.0	1.87	5.02	5.3	14.2
PET	2.5	26.1	2.13	4.20	6.0	11.9
PET	4.0	27.1	1.42	2.75	4.0	7.8
PET	7.0	28.4	1.71	2.72	4.8	7.7

NOTE 1—See Table 3 for footnote explanation.

laboratory or in different laboratories, the means should be judged not equivalent if they differ by more than the  $R$  value for that material.

13.3.3 Any judgment made in accordance with 13.3.1 and 13.3.2 would have an approximate 95 % (0.95) probability of being correct.

13.3.4 For further information, see Practice E 691.

13.4 *Bias*—The systematic error which contributes to the difference between a test result and a true (or reference) value.

There are no recognized standards on which to base an estimate of bias for these test methods.

#### 14. Keywords

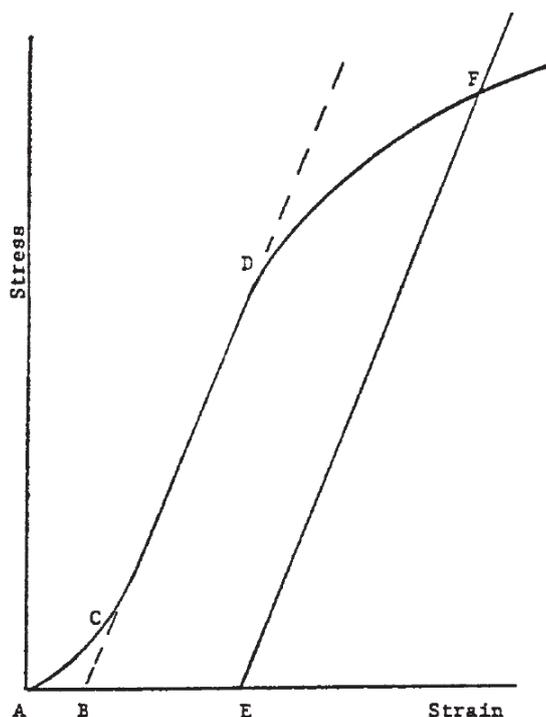
14.1 modulus of elasticity; plastic film; plastic sheeting; tensile properties; tensile strength; toughness; yield stress

## ANNEXES

### (Mandatory Information)

#### A1. TOE COMPENSATION

A1.1 In a typical stress-strain curve (Fig. A1.1) there is a



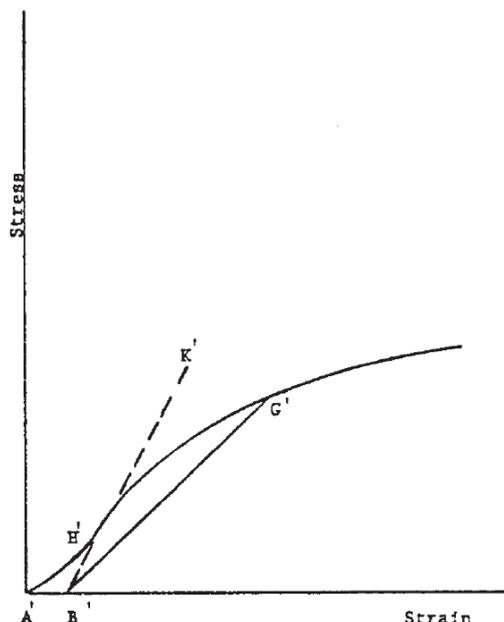
toe region,  $AC$ , which does not represent a property of the material. It is an artifact caused by a takeup of slack, and alignment or seating of the specimen. In order to obtain correct values of such parameters as modulus, strain, and offset yield point, this artifact must be compensated for to give the corrected zero point on the strain or extension axis.

A1.2 In the case of a material exhibiting a region of Hookean (linear) behavior (Fig. A1.1), a continuation of the linear ( $CD$ ) region of the curve is constructed through the zero-stress axis. This intersection ( $B$ ) is the corrected zero-strain point from which all extensions or strains must be measured, including the yield offset ( $BE$ ), if applicable. The elastic modulus can be determined by dividing the stress at any point along the line  $CD$  (or its extension) by the strain at the same point (measured from point  $B$ , defined as zero-strain).

A1.3 In the case of a material that does not exhibit any linear region (Fig. A1.2), the same kind of toe correction of the zero-strain point can be made by constructing a tangent to the maximum slope at the inflection point ( $H'$ ). This is extended to intersect the strain axis at point  $B'$ , the corrected zero-strain point. Using point  $B'$  as zero strain, the stress at any point ( $G'$ ) on the curve can be divided by the strain at that point to obtain a secant modulus (slope of line  $B'G'$ ). For those materials with no linear region, any attempt to use the tangent through the inflection point as a basis for determination of an offset yield point may result in unacceptable error.

NOTE 1—Some chart recorders plot the mirror image of this graph.

FIG. A1.1 Material with Hookean Region



NOTE 1—Some chart recorders plot the mirror image of this graph.

FIG. A1.2 Material with No Hookean Region

## A2. DETERMINATION OF TENSILE ENERGY TO BREAK

A2.1 Tensile energy to break (TEB) is defined by the area under the stress-strain curve, or

$$TEB = \int_0^{\epsilon_T} S \, d\epsilon \quad (A2.1)$$

where  $S$  is the stress at any strain,  $\epsilon$ , and  $\epsilon_T$  is the strain at rupture. The value is in units of energy per unit volume of the specimen's initial gage region. TEB is most conveniently and accurately measured with a tension tester equipped with an integrator. The calculation is then:

$$TEB = (I/K) \frac{(\text{full scale load}) (\text{chart speed}) (\text{crosshead speed/chart speed})}{(\text{mean caliper}) (\text{specimen width}) (\text{gage length})} \quad (A2.2)$$

where  $I$  is the integrator count reading and  $K$  is the maximum possible count per unit time for a constant full scale load. This whole calculation is typically done electronically. The results are best expressed in megajoules per cubic metre (or inch-pounds-force per cubic inch).

A2.2 Without an integrator, the area under the recorded stress-strain curve can be measured by planimeter, counting

squares, or weighing the cut-out curve. These techniques are time-consuming and likely to be less accurate, since the load scale on some chart paper is not in round-number dimensions. Moreover, if the curve coordinates are in terms of force and extension instead of stress and strain, the calculated energy, corresponding to the measured area, must be divided by the product of gage length, specimen width, and mean caliper:

$$TEB = \frac{(\text{curve area}) (\text{force per unit chart scale})}{(\text{extension per unit chart travel}) (\text{mean caliper}) (\text{specimen width}) (\text{gage length})} \quad (A2.3)$$

A2.3 For example, if the area under a force-extension curve is 60 000 mm<sup>2</sup>, the load coordinate is 2.0 N/mm of chart scale, the extension coordinate is 0.25 mm of extension per mm of chart travel, and the specimen dimensions are 0.1 mm caliper, 15 mm width and 100 mm gage length, then the calculation for tensile energy to break is:

$$TEB = \frac{(60\,000 \text{ mm}^2) (2.0 \text{ N/mm}) (0.25 \times 10^{-3} \text{ m/mm})}{(0.1 \times 10^{-3} \text{ m}) (15 \times 10^{-3} \text{ m}) (100 \times 10^{-3} \text{ m})} \quad (A2.4)$$

$$TEB = 200 \text{ MJ/m}^3$$



D 882

## SUMMARY OF CHANGES

This section identifies the location of selected changes to this test method. For the convenience of the user, Committee D20 has highlighted those changes that may impact the use of this test method. This section may also include descriptions of the changes or reasons for the changes, or both.

*D 882 – 02:*

(1) Revised 7.1 and 7.2.

*D 882 – 01:*

(1) Section 5.5 rewritten.

(2) Note 6 deleted.

(3) Added Practice D 6287 to Referenced Documents section.

*D 882 – 00:*

(1) Added 11.1.

*D 882 – 97:*

(1) Note 3 rewritten and moved.

(2) ISO equivalency statement changed in Note 4.

(3) ISO reference changed in 2.2.

(4) Apparatus section (Section 5) rewritten.

(5) Table 1 deleted. Table 2 renumbered as Table 1.

(6) Sections 10.3 and 10.4 rewritten.

(7) Note 13 deleted. New Note 12 added.

*ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.*

*This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.*

*This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-9585 (phone), 610-832-9555 (fax), or [service@astm.org](mailto:service@astm.org) (e-mail); or through the ASTM website ([www.astm.org](http://www.astm.org)).*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Departamento de Tecnologia



**OBS: Os resultados correspondem à média de 03 leituras (repetições) de tbars (oxidação lipídica) da carne.**

<b>Amostra</b>	<b>mg MDA/kg am</b>
<i>00 dia</i>	
01 VA NR	0,31
01 VA RE	0,33
02 VA NR	0,25
02 VA RE	0,26
03 VA NR	0,32
03 VA RE	0,32
<i>07 dias</i>	
01 VA RE	0,43
01 VA NR	0,39
01 NV RE	0,46
01 NV NR	0,38
02 VA RE	0,74
02 VA NR	0,44
02 NV RE	0,47
02 NV NR	0,49
03 VA RE	0,79
03 VA NR	0,65
03 NV RE	0,85
03 NV NR	0,87
<i>14 dias</i>	
01 NV RE	0,57
01 VA NR	0,38
01 VA RE	0,59
02 VA RE	0,41
02 VA NR	0,77
02 NV RE	0,43
03 VA RE	1,32
03 VA NR	0,96
03 NV RE	1,12
<i>21 dias</i>	
01 NV RE	0,87
01 VA RE	0,72
01 VA NR	0,63
02 NV RE	0,72
02 VA RE	0,72
02 VA NR	0,63



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**  
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
 Departamento de Tecnologia



03 NV RE	1,21
03 VA RE	0,95
03 VA NR	0,82
<i>28 dias</i>	
01 VA NR	0,73
01 NV RE	0,54
01 VA RE	0,54
02 VA NR	0,89
02 NV RE	0,83
02 VA RE	0,62
03 VA NR	0,76
03 NV RE	1,68
03 VA RE	1,89

Jaboticabal, 24 de Março de 2015.

**Dr. Pedro Alves de Souza**  
**Professor Titular**  
**Departamento de Tecnologia**  
**FCAV/UNESP**