



Universidade Federal do Rio Grande

Escola de Química e Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES PROTÉICOS A BASE
DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) INCORPORADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS**

MERITAINE DA ROCHA

Prof.Dr. Carlos Prentice-Hernández

Orientador

Rio Grande, RS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES PROTÉICOS A BASE DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) INCORPORADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS

MERITAINE DA ROCHA

Eng^a de Alimentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

ORIENTADOR

RIO GRANDE – RS

2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Lourdes, pela doação, dedicação, compreensão, amizade, amor incondicional e pelo apoio constante em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos e sobrinhos, que mesmo distantes, estão constantemente presentes em minha vida. Obrigada pelo apoio, carinho, incentivo, amor e por tornar a minha vida mais alegre. O sentido da vida está no amor em que sentimos uns pelos outros, pois a família é o bem mais precioso da vida.

A Deus, que me manteve forte durante o decorrer da minha vida. Afinal, temos que ter fé na vida para prosseguirmos acreditando em dias melhores. Obrigada por tudo que tenho na minha vida.

A minha querida afilhada Maria Clara e ao meu afilhado por trazer um sentido diferente para minha vida.

Ao Rodrigo pela compreensão, amizade, companheirismo, paciência e amor dedicado em todos os momentos dessa caminhada. Depois que nos encontramos, tudo mudou e descobri o significado do amor, amo você.

Ao Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández pela orientação, amizade, acolhimento, apoio e incentivo. Enfim, são poucas as palavras para mensurar tamanha importância da sua contribuição para a realização deste trabalho.

A minha nova família, pelo acolhimento e incentivo ao longo desta caminhada, especialmente à Marlene, Ieda, Rodolpho, Ricardo, Roseli, Rafa, Jéssica, Juliano, Diogo e Simone.

As minhas amigas e companheiras Dani, Sílvia e Tania por todo apoio, amizade e palavras de incentivo nos momentos incertos e certos. Também, pelos momentos de diversão compartilhados.

A, recém doutora, Michele por todo conhecimento, amizade e palavras de incentivo.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, especialmente à Ariane, Ana Paula, Carolina, Elessandra, Fabiano, Gabriela, Gilberto, Inajara, Irene, Janise, Márcia, Marcondes, Rafael, Renata e Viviane, pois sem o incentivo e compreensão de todos com certeza a caminhada teria sido mais difícil.

A Sabrine, uma pessoa ímpar, que contribui para o desenvolvimento de todos os trabalhos do nosso Laboratório. Obrigada pela amizade, paciência e disposição, pois neste trabalho tem muito do teu esforço.

As minhas grandes companheiras de caminhada, Priscila e Shanise, que agora seguem por caminhos diferentes, porém com o mesmo objetivo da realização profissional e pessoal. O importante é que no fim tudo deu certo e compartilhamos momentos da importância de um grão de gergelim.

Aos estagiários Gabrielle, Roger, Joyce, Annie e Dennis pela colaboração nos experimentos realizados, contribuição e pela ótima companhia.

A Prof. Dr. Eliana Badiale Furlong por todos os anos de orientação durante a graduação. Também pela amizade, conselhos, momentos de felicidade e realização que me proporcionou.

A Prof. Dr. Myriam por todos os conselhos e conhecimentos transmitidos, foram de grande valia para a vida. Aprendi que uma laranjeira nunca deixa de ser uma laranjeira.

Ao Prof. Dr. Eduardo César Tondo e toda sua equipe, pela acolhida no Laboratório de Microbiologia e Controle dos Alimentos, que possibilitou o desenvolvimento das partes cruciais desta pesquisa. Um trabalho em parceria resulta em desenvolvimento para todos.

A Márcia Loiko por todo conhecimento, auxílio, compreensão prestados e também pelos momentos de amizade compartilhados. Estes foram fundamentais para o fechamento deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do Mestrado, onde pude contar com a colaboração de todos.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela colaboração e simpatia.

A todos os laboratórios que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao povo brasileiro, que através do pagamento dos impostos, ajudam e possibilitam o desenvolvimento científico e tecnológico do Brasil.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
NOMENCLATURAS	xiii
RESUMO GERAL	xv
GENERAL ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
2.OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Pesca extrativa no Brasil	6
3.1.2 Anchoita (<i>Engraulis anchoita</i>)	6
3.1.3 Proteínas do pescado	8
3.2 Proteína e suas estruturas	10
3.2.1 Ponto isoelétrico da proteína	11
3.2.2 Isolamento das proteínas de pescado	12
3.3 Filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis	13
3.3.1 Propriedades de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis	17
3.3.1.1 Propriedades mecânicas	17
3.3.1.2 Propriedades de barreira	18
3.3.1.3 Propriedades ópticas: cor e opacidade	19
3.3.1.4 Solubilidade	19
3.3.1.5 Espessura	19

3.4 Filmes antimicrobianos	20
3.4.1 Mecanismo de ação dos antimicrobianos	22
3.5 Microrganismos associados a doenças transmitidas por alimentos	24
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	25
3.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	25
3.5.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis	26
3.5.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
3.6 Carne bovina	27
CAPÍTULO III	30
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	31
ARTIGO 1	32
Efeito do Tratamento Térmico, Concentração de Plastificante e de Proteína nas Propriedades Físico-químicas de Filmes à Base de Isolados Protéicos de anchoita (<i>Engraulis anchoita</i>)	32
RESUMO	33
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Material	36
2.2 Obtenção do isolado protéico de anchoita	36
2.3 Caracterização da carne mecanicamente separada e do isolado protéico de anchoita (<i>Engraulis anchoita</i>)	38
2.3.1 Composição proximal	38
2.3.2 Composição de aminoácidos	38
2.3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	38
2.4 Elaboração dos filmes à base de isolado protéico de anchoita	38
2.5 Caracterização dos filmes	40
2.5.1 Espessura	40

2.5.2 Solubilidade em água	40
5.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	41
2.5.4 Propriedades mecânicas.....	41
2.5.6 Cor e opacidade	42
2.5.7 Microestrutura dos filmes	42
2.6 Planejamento Experimental	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Caracterização da carne mecanicamente separada e do isolado protéico de anchoita.....	43
3.1.2 Composição proximal	43
3.1.3 Composição de aminoácidos	44
3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	45
3.4 Caracterização dos filmes à base de isolado protéico de anchoita	46
3.4.1 Espessura.....	48
3.4.2 Solubilidade dos filmes	48
3.4.3 Permeabilidade ao vapor de água - PVA	50
3.4.4 Propriedades mecânicas.....	51
3.4.5 Cor e Opacidade.....	54
3.5 Microestrutura dos filmes	55
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ARTIGO 2	65
Propriedades Físico-químicas dos Filmes à Base de Isolado Protéico de Pescado Incorporados com Ácidos Orgânicos e sua Ação Antimicrobiana contra Patógenos alimentares	65
RESUMO	66
ABSTRACT	66
1. INTRODUÇÃO	67

2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Matéria-prima.....	69
2.1.2 Reagentes	69
2.1.3 Cepas bacterianas	69
2.2 Obtenção do isolado protéico de anchoita	69
2.3 Elaboração dos filmes antimicrobianos	70
2.3.1 Caracterização dos filmes antimicrobianos	71
2.3.1.2 Análise microbiológica dos filmes antimicrobianos.....	71
2.3.1.2 Espessura.....	72
2.3.1.3 Solubilidade em água	72
2.3.1.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	72
2.3.1.5 Propriedades mecânicas.....	73
2.3.1.6 Cor e opacidade.....	73
2.3.1.7 Microestrutura dos filmes	74
2.3.1.8 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT- IV).....	74
2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com os ácidos orgânicos	74
2.5 Aplicação dos filmes de maior atividade antimicrobiana em carne bovina	75
2.5.1 Análises microbiológicas da carne bovina embalada com os diferentes filmes	75
2.6 Análise estatística	76
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 Caracterização do isolado protéico	77
3.2 Caracterização dos filmes antimicrobianos	77
3.2.1 Análises microbiológicas.....	77
3.2.2 Espessura.....	78
3.2.3 Solubilidade em água	78
3.2.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	79

3.2.5 Propriedades mecânicas.....	80
3.2.6 Cor e Opacidade.....	81
3.2.7 Microestrutura dos filmes.....	83
3.2.8 Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IV).....	84
3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com os ácidos orgânicos.....	86
3.4 Aplicação dos filmes de maior atividade antimicrobiana em carne bovina	89
4. CONCLUSÃO	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CAPÍTULO IV	103
4. CONCLUSÃO GERAL.....	104
CAPÍTULO V	105
5 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	106
APÊNDICES	129
Apêndice 1.....	130
Apêndice 2.....	131
Apêndice 3.....	132
Apêndice 4.....	133
Apêndice 5.....	134
Apêndice 6.....	135
Apêndice 7.....	136
Apêndice 8.....	137
Apêndice 9.....	138
Apêndice 10.....	139
Apêndice 11.....	140
Apêndice 12.....	141
Apêndice 13.....	142
Apêndice 14.....	143

Apêndice 15.....	144
------------------	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Níveis codificados das variáveis para a elaboração dos filmea à base de (IPA).....	39
Tabela 2 - Composição proximal da carne mecanicamente separada de anchoita (CMSA) e a composição proximal do isolado protéico de anchoita (IPA) seco a 40°C	43
Tabela 3 - Composição de aminoácidos (mg aminoácidos.100 g ⁻¹ IPA) do isolado protéico de anchoita	44
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas apresentadas por filmes elaborados à base de isolados protéicos de anchoita	47
Tabela 5 - Modelos da curva de contorno de regressão para os parâmetros de e solubilidade (S), resistência à tração (RT) e alongação (E).....	49
Tabela 6 - Propriedades físico-químicas de filmes a base de isolado protéico de anchoita com e sem a adição de antimicrobianos	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anchoita (<i>Engraulis anchoita</i>).....	7
Figura 2- Classificação das proteínas musculares	9
Figura 3- Unidade básica da proteína formando o esqueleto polipeptídico.....	11
Figura 4 - Filme biodegradável.....	14
Figura 5 - Fluxograma do processo de obtenção do isolado protéico de anchoita.	37
Figura 6 - Fluxograma do processo de elaboração de filmes à base de IPA	39
Figura 7 - Termograma apresentado pelo isolado protéico de anchoita.	46
Figura 8 – Curva de contorno da resposta solubilidade: (a) conteúdo de isolado protéico de anchoita versus tratamento térmico (b) tratamento térmico versus concentração de glicerol.	50
Figura 9 – Curva de contorno da resposta resistência à tração: (a) tratamento térmico versus conteúdo glicerol; (b) tratamento térmico versus conteúdo de isolado protéico de anchoita.....	52
Figura 10 – Curva de contorno da resposta alongação: (a) conteúdo de glicerol versus conteúdo de isolado protéico de anchoita; (b) tratamento térmico versus conteúdo de glicerol.	53
Figura 11 - Micrografias da superfície dos filmes à base de isolado protéico de anchoita em magnificação de 2000x - (a) 3,0 g IPA 100 g ⁻¹ SF com 30 g de glicerol 100g ⁻¹ IPA e (b) 3,0 g IPA 100g ⁻¹ SF com 40 g de glicerol 100 g ⁻¹ IPA e tratamento térmico de 74 °C; (c) 3,0 g IPA 100g ⁻¹ SF com 30 de glicerol 100 g ⁻¹ IPA; (d) 3,0 g IPA 100g ⁻¹ SF com 40 g de glicerol 100 g ⁻¹ IPA e tratamento térmico de 90 °C.....	55
Figura 12 - Fluxograma da elaboração dos filmes antimicrobianos	70
Figura 13 - Diferença de cor (ΔE^*) e opacidade (Y) dos filmes elaborados com e sem agentes antimicrobianos.....	82
Figura 14 - Micrografias da superfície dos filmes (a) controle (pH 11,5); (b) 1,50% de ácido sórbico; (c) 1,50% de ácido benzóico.....	84
Figura 15 - Espectros de absorção da região do infravermelho dos filmes de isolado protéico de anchoita incorporados com ácido sórbico (1,50%), ácido benzóico (1,50%) e o controle (pH 11,5).	85

Figura 16 – Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de anchoita com ou sem incorporação de agentes antimicrobianos.....	86
Figura 17 – Efeito dos filmes antimicrobianos (p/v na solução filmogênica) sobre a multiplicação de <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>L. monocytogenes</i> em carne bovina.....	90

NOMENCLATURAS

AB – Ácido benzóico;
ANOVA - Análise de variância;
AS – Ácido sórbico;
 A_w – Atividade de água;
BPF – Boas Práticas de Fabricação;
cm – centímetro;
 cm^3 – Centímetro cúbico;
CMSA – Carne mecanicamente separada de anchoita;
d – Dia;
DCC – Delineamento composto central;
 d_f – Separação entre as garras no momento da ruptura;
 d_o – Separação inicial entre as garras;
DSC – Calorimetria diferencial de varredura;
DTA – Doença Transmitida por Alimentos;
E – Elongação;
ES – Espessura;
 F_m – Força máxima no momento da ruptura;
FURG – Universidade Federal do Rio Grande;
G – Glicerol;
g – Gramas;
GRAS – Geralmente Reconhecida como Segura;
ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos;
INEI – Instituto Nacional do Ministério da Saúde da Argentina;
IPA – Isolado protéico de anchoita;
IPS – Solubilização e precipitação isoelétrica;
kg - Quilograma;
kPa – Quilopascal;
kV – quilovolt;
LACEN/RS – Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul;
LTA – Laboratório de Tecnologia de Alimentos;
m – Metro;
 m^2 – Metro quadrado;
 m_f – Massa final;

mg – miligramas;
m_i – Massa inicial;
min – Minutos;
mL – Mililitro;
mm – Milímetros;
MMA – Ministério do Meio Ambiente;
N – Newton;
Pa – Pascal;
pH – Potencial hidrogeniônico;
pI – Ponto isoelétrico;
PRO – Ácido propiônico;
PVA – Permeabilidade ao vapor de água;
RT – Resistência à tração;
s – Segundo;
S – Solubilidade;
SF – Solução filmogênica;
SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária;
T – Temperatura;
UFC – Unidade formadora de colônia;
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
UR – Umidade relativa;
X₁- Concentração de isolado protéico;
X₂- Concentração de glicerol;
X₃ – Tratamento térmico;
Y – Opacidade;
ZEE – Zona Econômica Exclusiva;
ΔE* - Diferença de cor;
ΔH – Entalpia;
ΔP – Diferença de pressão parcial;
ΔW – Ganho de massa pela célula;

RESUMO GERAL

Os filmes são produzidos a partir de macromoléculas, que podem ser utilizados como embalagem, como os polissacarídeos, lipídeos e proteínas. As proteínas se destacam dos demais, pois possuem uma estrutura com 20 monômeros diferentes, que confere um amplo potencial de ligações intermoleculares. A incorporação de agentes ativos em filmes é uma alternativa como embalagem, para inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de filmes à base de isolado protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*) – IPA adicionados de ácidos orgânicos. Para tanto, foi elaborado o IPA, pela solubilização alcalina da proteína e precipitação no ponto isoelétrico a partir de carne mecanicamente separada. O IPA foi avaliado quanto a sua composição proximal, aminoacídica e por DSC. A solução formadora dos filmes foi elaborada a partir de IPA, água, glicerol e hidróxido de sódio. As formulações dos filmes foram elaboradas segundo um planejamento fatorial 2³. Foram avaliadas as propriedades físico-químicas de resistência a tração (RT) e alongação (E); espessura, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA); a diferença de cor (ΔE^*) e opacidade (Y) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) de filmes à base de IPA. Os filmes com diferentes concentrações de ácido sórbico (AS) ou ácido benzóico (AB) foram desenvolvidos a partir da condição cujo as propriedades físico-químicas foram as melhores, sendo comparados aos filmes controles. Estes, foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis pelo método de difusão em disco, além das propriedades físico-químicas, MEV e FT-IV. Os filmes com maior atividade antimicrobiana e os filmes controle foram aplicados sobre carne bovina, inoculados com os microrganismos inibidos no método de difusão em disco e armazenados a 5°C. Estes, foram avaliados a cada 2 dias durante 12 dias de armazenamento, pela método de contagem em gotas. O IPA apresentou 88,8% de proteína e 53,3% de aminoácidos polares e temperatura de desnaturação de 62,2°C. A espessura, PVA, ΔE^* e Y dos filmes não foram afetados pelas variáveis estudadas no experimento. A menor solubilidade e maior RT dos filmes ocorreram em baixa concentração de IPA, glicerol e tratamento térmico, mas a E aumentou com o acréscimo dessas variáveis. As MEV das superfícies dos filmes foram homogêneas, para aqueles com leve tratamento térmico. O aumento da concentração de AS e AB na faixa de 0,50 a 1,50% resultou na diminuição da RT e aumento da E, solubilidade, ΔE^* e Y. Houve mudança da organização molecular e interações intermoleculares entre as moléculas de IPA e AB testados pela avaliação do FT-IV. As MEV revelaram microporos em filmes com 1,50% de AS, o que resultou em filmes com menor homogeneidade. A maior atividade antimicrobiana foi verificada nos filmes com 1,50% de AS e AB frente a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. Estes filmes foram aplicados sobre carne bovina inoculada com *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*. Os filmes de AS frente a *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* apresentaram uma redução de 5 e 4 log UFC.g⁻¹, respectivamente, em relação ao filme controle. O efeito do AB frente a estas bactérias, apresentou uma redução de 6 e 5 log UFC.g⁻¹, ao final do 12º dia de armazenamento, respectivamente. Os filmes elaborados à base de IPA, adicionados de AS ou AB podem ser eficazes contra os patógenos alimentares testados.

Palavras-chave: pescado, isolado protéico, microrganismos, agentes antimicrobianos.

**Evaluation of the antimicrobial activity of films based on Argentine Anchovy
(*Engraulis anchoita*) protein isolated added with organic acids**

GENERAL ABSTRACT

The films are produced from macromolecules, which may be used as packaging, such as polysaccharides, lipids and proteins. The proteins stand out from the others because they have a structure with 20 different monomers, which confers broad potential for intermolecular bonds. The incorporation of active agents in films is an alternative for packaging, to inhibit or retard the multiplication of pathogens and spoilage microorganisms in foods. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of films based on Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) - API protein isolate added organic acids. To that end we developed the API by protein alkaline solubilization and precipitation at the isoelectric point from mechanically recovered meat. The API was evaluated on their proximal and amino acid composition and by DSC. The forming solution of the films was made from API, water, glycerol and sodium hydroxide. The formulations of the films were prepared using a 2³ factorial design. We evaluated the physicochemical properties of tensile strength (TS) and elongation (E), thickness, solubility and permeability to water vapor (WPV), the color difference (ΔE^*) and opacity (Y) and electron microscopy (SEM) of films based on API. The films with different concentrations of sorbic acid (AS) or benzoic acid (BA) were developed from the condition which the physicochemical properties were the best, being compared to films controls. These were evaluated for their antimicrobial activity against microorganisms *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis by disk diffusion method, and the physicochemical properties, SEM and FT-IR. The films with higher antimicrobial activity and control films were applied on beef, inoculated with microorganisms inhibited the disk diffusion method and stored at 5 °C. These were evaluated every 2 days during 12 days storage, by drops counting method. API had 88.8% protein and 53.3% of polar amino acids and denaturation temperature of 62.2 °C. The thickness, WPV, ΔE^* and Y of the films were not affected by variables in the experiment. The lower solubility and higher TS of the films occurred in a low concentration of API, glycerol and heat treatment, but E increased with the addition of these variables. The SEM of the surfaces of the films were homogeneous, for those with mild heat treatment. Increasing the concentration of AS and BA in the range 0.50 to 1.50% resulted in a decrease in TS and increased E, Y and ΔE^* . There was a change of the molecular organization and intermolecular interactions between the molecules of API and BA tested by FT-IR evaluation. The SEM revealed micropores in films with 1.50% of SA, which resulted in films with less homogeneity. The greatest antimicrobial activity was observed for films with 1.50% of SA and BA against *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*. These films were applied on beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*. The SA films against *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* show a reduction of 5 and 4 log CFU.g⁻¹, respectively, in relation to the control film. The effect of AB against these bacteria showed a reduction of 6 and 5 log CFU.g⁻¹ at the end of the 12th day of storage, respectively. The films based on API added SA or BA can be effective against foodborne pathogens tested.

Keywords: fish, protein isolate, microorganisms, antimicrobials agents.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos há grande interesse na elaboração de filmes a partir de polímeros provenientes de fontes renováveis e naturais, tais como polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Estes são destinados a minimizar o impacto das embalagens de materiais sintéticos ao ambiente (BOURTOOM, 2009). O aumento no consumo e a forte acumulação destes materiais no ambiente, que levam anos para se degradar, hoje são considerados um problema em nível mundial (BLÁCIDO, 2006).

Os filmes são produzidos basicamente a partir de macromoléculas capazes de formar matrizes contínuas e coesas (TURBIANI, 2007). Dentre os diversos materiais pesquisados para a produção de filmes, as proteínas se destacam dos demais, pois possuem uma estrutura com 20 monômeros diferentes, o que confere uma ampla gama de propriedades funcionais, especialmente um potencial para ligações intermoleculares. Filmes a base de proteínas podem formar ligações em posições diferentes e oferecem grande potencial para a formação de numerosas ligações (OU et al., 2005).

As proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas do músculo do pescado foram estudadas em várias pesquisas (SOBRAL et al, 2002; TANAKA et al, 2001; SOBRAL, 2000). As proteínas miofibrilares são insolúveis em água, mas podem ser extraídas através da variação de pH da solução. A anchoita (*Engraulis anchoita*) é um pescado pelágico pouco explorado, que desperta interesse para o desenvolvimento de produtos com alto valor agregado, tal como os isolados protéicos (GOULAS e KONTOMINAS, 2005).

Os alimentos são normalmente susceptíveis a agentes físicos, químicos e microbiológicos que podem causar deterioração, veicular patógenos durante o armazenamento, distribuição tanto como as condições ambientais a que são expostos (CHA e CHINNAN, 2004). Uma seleção adequada de materiais de embalagem pode minimizar a perda de qualidade dos alimentos, fornecendo barreira, ou não, aos mesmos recursos de proteção (CAMPOS et al., 2011).

O uso de filmes contendo agentes antimicrobianos apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais de adição direta de conservantes nos alimentos tais como o ácido sórbico e benzóico, visto que podem ser liberados de maneira controlada, estando, portanto, em menor quantidade no alimento e atuando, principalmente, na superfície do produto. Também pode ocorrer a inibição ou redução da atividade do antimicrobiano, quando adicionado de forma tradicional, por diversas substâncias do próprio alimento (KRISTO et al., 2008; QUINTAVALLA e VICINI, 2002).

Dentre os conservantes utilizados em alimentos, os ácidos orgânicos merecem destaque por possuírem baixa interferência no sabor e baixo nível de toxicidade (MORAES et al., 2007). Substâncias como ácido sórbico (LIMJAROEN et al., 2003), ácido benzóico (SOARES et al., 2002) e seu sais (BUONOCORE et al., 2003) são considerados conservantes de alimentos Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS).

Manab et al. (2011) e Cagri et al. (2001) em seus estudos verificaram que filmes a base de isolado protéico de soro de leite, incorporados com ácido sórbico e ácido benzóico inibiram a multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. Pesquisas têm demonstrado eficiência dos filmes também contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonellas*, coliformes, bactérias psicrotróficas entre outras.

O Brasil é o maior país exportador de carne bovina no mundo, a carne é um excelente substrato na multiplicação de inúmeros microrganismos, entre eles encontram-se a *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* (ABIEC, 2011; TONDO e BARTZ, 2011). A carne está exposta a contaminações de natureza microbiana em todas as fases do seu processamento, particularmente nas operações em que é muito manipulada e sempre que não sejam tomados cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Fabricação (SOFOS et al., 2008; PARDI et al., 2001). A carne e os produtos cárneos são um dos principais veículos de doenças de origem alimentar, também são propensos a deterioração durante o armazenamento como todos os alimentos protéicos (CARDENAS et al., 2008).

Uma das formas de controlar a multiplicação dos microrganismos nestes produtos, com aumento da segurança dos alimentos, é a aplicação de antimicrobianos na superfície do produto (KERRY et al., 2006). Dentro desse contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de filmes à base de isolado protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*) incorporados com ácido sórbico e ácido benzóico.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana de filmes elaborados à base de isolado protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*) adicionados de ácido sórbico e ácido benzóico.

2.2 Objetivos específicos

- Obter isolados protéicos a partir da carne mecanicamente separada de anchoita (CMSA) e utilizá-los como base protéica para elaboração de filmes;
- Estudar as melhores condições de concentração de plastificante e proteína; e temperatura para desenvolvimento de filmes;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes protéicos, incorporados com diferentes concentrações de ácido sórbico e ácido benzóico sobre o desenvolvimento de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*;
- Avaliar o efeito da incorporação dos agentes antimicrobianos nas propriedades físico-químicas dos filmes;
- Aplicar os filmes ativos em carne bovina mantida sob refrigeração, a partir da formulação que apresentar a maior atividade antimicrobiana.

CAPÍTULO II

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pesca extrativa no Brasil

O Brasil possui cerca de 8.500 km de litoral e um número razoável de ilhas, totalizando uma área de aproximadamente 3,5 milhões de km² de Zona Econômica Exclusiva (ZEE), que se estende desde o Cabo Orange (5°N) até o Chuí (34°S). Apesar disso, o país é o 27° produtor mundial de pescados, atrás de países como Chile, Peru e Argentina. A produção brasileira de pescado aumentou 25% nos últimos oito anos passando de 990.899 toneladas anuais para 1.240.813, toneladas segundo dados estatísticos de 2008 e 2009 (BRASIL, 2010).

O estado do Rio Grande do Sul é responsável por aproximadamente 25% do pescado industrializado no país. Até a década de 1990 o parque industrial pesqueiro instalado em Rio Grande correspondia aproximadamente 50% da capacidade da indústria pesqueira do Brasil, atualmente estão concentradas 80% das indústrias pesqueiras do estado nesta cidade (GARCIA, 2007).

O porto pesqueiro da cidade do Rio Grande é o maior centro pesqueiro do Rio Grande do Sul. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), em 2008 o Rio Grande do Sul apresentou um desembarque mensal de pesca industrial de 23.373.007 kg de diferentes espécimes (BRASIL, 2009). Espécies de pescado de baixo valor comercial vêm sendo amplamente estudadas com a finalidade de transformar essa matéria-prima em produtos de alto valor agregado.

3.1.2 Anchoita (*Engraulis anchoita*)

A anchoita (*Engraulis anchoita*), apresentada na Figura 1, é uma espécie pelágica que habita uma larga área na plataforma desde o Golfo de São Jorge na Argentina, e no Brasil do Cabo Frio (Rio de Janeiro - RJ) até o Chuí (Rio Grande do Sul – RS) (CASTELLO e CASTELLO, 2003), entre outras plataformas. A espécie é encontrada a uma profundidade entre 10 e 200 m, em uma amplitude de temperaturas superficiais que variam de 8 a 23°C e salinidade de 14-35 ppt (HANSEN et al., 1984). Esta espécie apresenta o comprimento padrão de 17 cm, entretanto pode chegar a 21 cm (FAO, 2011).



Figura 1 - Anchoita (*Engraulis anchoita*)

FONTE: Zero Hora – novembro de 2011.

O pico reprodutivo no sul do Brasil ocorre durante o inverno e a primavera. Nesta época a região entre o Cabo de Santa Marta Grande e Rio Grande é ocupada por anchoitas juvenis, que estão próximas da costa. A região entre Rio Grande e a divisa com o Uruguai, é ocupada por adultos e, entre a costa e os 20 - 30m de profundidade, por juvenis imaturos (SCHWINGEL e CASTELLO, 2000).

A anchoita é uma espécie essencialmente zooplantófaga, mas ocasionalmente e com baixa importância volumétrica (< 2,5%), apresenta alimentação fitoplantófaga filtrando diatomáceas cêntricas e penadas e alguns flagelados. Pode-se dizer ainda, de acordo com Schwingel (1991), que considerando todo o ciclo vital da espécie, a anchoita tem um habitat trófico-espaço-temporal diferenciado pelas características de temperatura, salinidade e diversidade de presas, própria de cada massa de água em que ocorre.

Segundo Yeannes e Casales (1995), a composição proximal da anchoita varia em função das diferentes estações do ano, apresentando oscilações de 69,5 a 79,6% para o teor de umidade, de 15,8 a 19,28% para proteína, de 1,4 a 9,4% para lipídeos, e de 1,2 a 2,1% de cinzas entre os meses de maio e novembro, respectivamente. Estas variações podem ocorrer também devido a fatores como sexo, tamanho, ciclo reprodutor e alimentação como em outros pescados (BADOLATO et al., 1994).

Segundo Madureira et al. (2009), estima-se que até 135.000 toneladas de anchoita poderiam ser exploradas de forma sustentável ao longo do litoral sul brasileiro. Entretanto apesar da sua abundância, esta espécie não é capturada no

país. Esta falta de exploração ocorre devido à falta de mercado para a espécie, de introdução de tecnologia adequada à pesca, inviabilização econômica do recurso e sistema de armazenamento para preservar a qualidade ao longo da cadeia produtiva (SCHWINGEL e CASTELLO, 2000).

Outro fator relevante pelo qual esta matéria-prima é descartada ou processada como produto de baixo valor comercial, deve-se especialmente a ser um pescado de carne escura, suscetível à oxidação e com sabor residual (THIANSILAKUL et al., 2007). Esses fatores decorrem em função do alto conteúdo de lipídeos, proteínas solúveis, bem como pigmentos e óxido de trimetilamina. A busca de soluções comuns para melhorar a utilização dos anchos deve evoluir a partir de uma forte interação técnico-científica e da colaboração mútua do governo (MADUREIRA et al., 2009).

Em outros países, as formas de aproveitamento deste pequeno pelágico variam desde produtos com alto valor agregado, tal como as espécimes europeias (*Engraulis encrasilocus*), até o caso da redução em farinha de pescado como é o caso da anchoveta peruana (*Engraulis ringens*) (HERRERA e CORREO, 1997). No Uruguai e na Argentina, ela é comercializada na forma marinada, ou pescado fresco, entre outros (SCHWINGEL e CASTELLO, 2000).

Segundo Sathivel e Bechtel (2006), pescados e subprodutos de espécies marinhas, são fontes de proteínas de elevada qualidade. Vários estudos têm destacado o uso de pescado de baixo valor comercial como fonte para obtenção de produtos com maior valor agregado, dentre os quais se destacam os hidrolisados protéicos e as proteínas modificadas enzimaticamente entre outros (KRISTINSSON e RASCO, 2000).

3.1.3 Proteínas do pescado

As proteínas do pescado, dependendo de sua solubilidade podem ser divididas em sarcoplasmáticas, miofibrilares e insolúveis ou do estroma. Estas últimas têm menos interesse no pescado do que na carne, destacando-se nos dois casos, o colágeno e a elastina (ORDÓÑEZ, 2005). O músculo do pescado é rico em proteínas miofibrilares e pobre em proteínas do estroma, sendo a conjugação das fibras menos compacta, razão por ser mais frágil que o músculo dos mamíferos (OGAWA e MAIA, 1999). Existe uma classificação que divide as proteínas musculares em proteínas intracelulares e intercelulares, conforme apresenta a Figura 2.

As proteínas intracelulares incluem as proteínas sarcoplasmáticas (do plasma celular) e as miofibrilares (da estrutura muscular). As proteínas intercelulares incluem as proteínas do estroma (do tecido conectivo) e as proteínas insolúveis (dos vasos sanguíneos, nervos) (SIKORSKI et al., 1994).

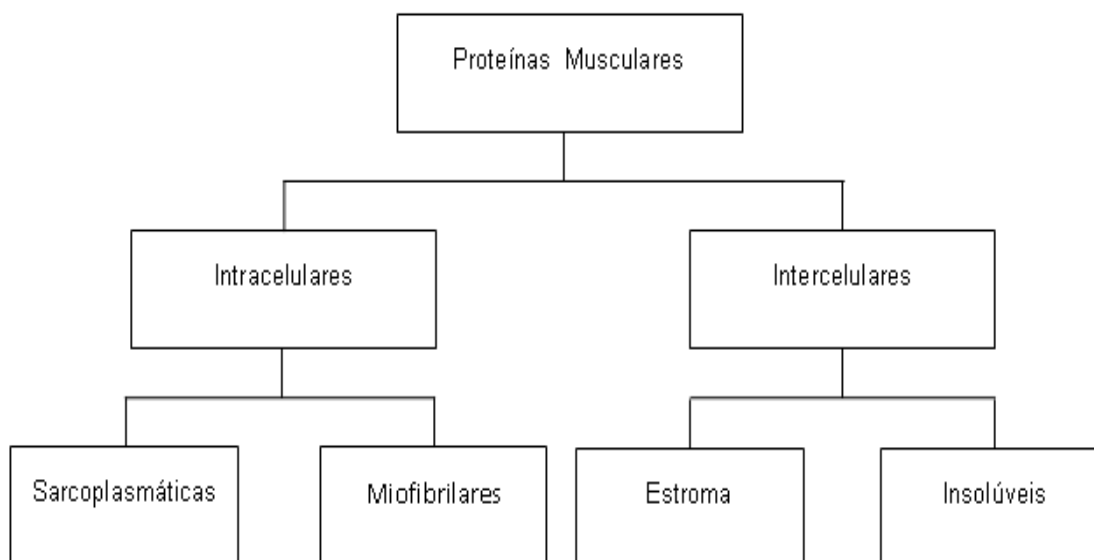


Figura 2- Classificação das proteínas musculares

Fonte: (OGAWA & MAIA, 1999)

As proteínas sarcoplasmáticas são encontradas no citoplasma de células musculares (OGAWA e MAIA, 1999). Elas compreendem cerca de 20 - 30% do total das proteínas do músculo do pescado são solúveis em água e soluções salinas diluídas. Estas proteínas compreendem mais de 100 tipos diferentes, sendo as principais: enzimas da glicólise, parvalbumina e mioglobina (SIKORSKI, 1994). Segundo Paschoalick et al. (2003) as proteínas sarcoplasmáticas são facilmente separadas através de um processo de lavagem do músculo de pescado.

As proteínas do estroma do músculo apresentam menor solubilidade, esta fração contém as proteínas do sarcolema, do retículo endoplasmático assim como as proteínas do tecido conjuntivo. As principais proteínas do tecido conjuntivo são o colágeno e a elastina, que representam mais de 50% das proteínas do estroma, esta proporção varia de acordo com o músculo e com o animal (CHEFTEL et al., 1989).

O grupo de proteínas miofibrilares ocupa lugar de grande importância do ponto de vista nutritivo e também tecnológico. No pescado, as proporções de proteínas

miofibrilares correspondem a 65 – 75%, sendo superior à carne de animais de abate, mas basicamente encontram-se os mesmos tipos de proteínas (ORDÓÑEZ, 2005).

As proteínas miofibrilares conferem às células musculares sua propriedade contráctil, influenciando tecnologicamente nas qualidades dos músculos, pois são responsáveis pela capacidade de retenção de água, propriedades emulsificantes e também pela brandura da carne, contendo ainda quantidades importantes de aminoácidos essenciais, contribuindo assim em mais de 70% do suporte protéico devido ao consumo de carne. Músculos brancos de pescado contêm menos proteínas miofibrilares do que os vermelhos (SIKORSKI, 1994; ISHIKAWA et al., 1974).

Em meados dos anos noventa, Cuq et al. (1997) em seus estudos com a sardinha do Atlântico, demonstraram que as proteínas miofibrilares tinham a capacidade de formar filmes transparentes e resistentes. Desde então, outros trabalhos foram realizados com proteínas miofibrilares de pescado visando o uso alternativo e agregando valor a estas.

3.2 Proteína e suas estruturas

As proteínas são polímeros de elevada massa molecular, cujas unidades básicas são os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas (BOBBIO e BOBBIO, 2003). Elas também são chamadas de polipeptídeos, pois os aminoácidos que as compõem são unidos por ligações peptídicas; estas ligações ocorrem através da união do grupo amino ($-NH_2$) de um aminoácido com o grupo carboxila ($-COOH$) de outro aminoácido, formando uma amida (FENNEMA, 1993).

As proteínas são formadas por 20 aminoácidos diferentes, cada um com uma característica química distinta. Cada aminoácido possui uma cadeia lateral diferente ligada ao carbono alfa ($C\alpha$). As cadeias laterais (R_1 e R_2), Figura 3, conferem a cada aminoácido suas características químicas próprias (ALBERTS et al., 2005).

As cadeias laterais podem diferir bastante em seu tamanho, forma e propriedades químicas, sendo comum agruparem-se os aminoácidos em quatro classes, com base na sua polaridade: apolares, ou hidrofóbicos, polares neutros, carregados positivamente, ou básicos, e carregados negativamente, ou ácidos (ALBERTS et al., 2005).

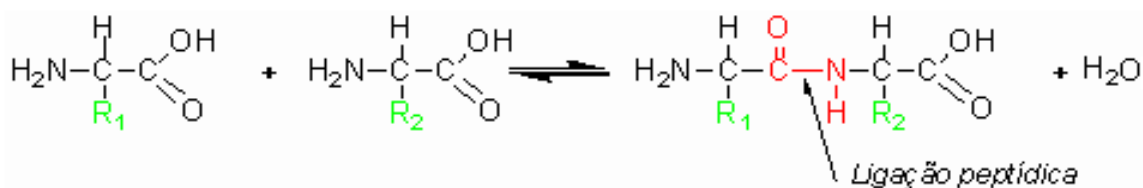


Figura 3- Unidade básica da proteína formando o esqueleto polipeptídico

Fonte: (ALBERTS et al., 2005)

A sequência de aminoácidos que se repetem para formar uma proteína é característica para cada polipeptídeo. Esta sequência é conhecida como estrutura primária, a qual determina a forma e a função da proteína, sem se preocupar com a orientação espacial da molécula (LEHNINGER et al., 2000).

A estrutura secundária se refere ao arranjo regular, repetitivo no espaço da cadeia polipeptídica ao longo de uma dimensão, esta estrutura é evidente nas proteínas fibrosas, na qual as cadeias de proteínas apresentam conformação estendida ou espiralada. Ela ocorre também em segmentos das cadeias polipeptídicas nas proteínas globulares (LEHNINGER et al., 2000). A conformação espacial é mantida graças às interações intermoleculares entre os hidrogênios dos grupos amino e os átomos de oxigênio dos outros aminoácidos (FENNEMMA, 1993).

A estrutura terciária refere-se à maneira pela qual a cadeia polipeptídica encurva-se ou dobra-se em três dimensões, formando uma estrutura compacta firmemente enovelada (LEHNINGER et al., 2000). A estrutura é estabilizada por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e em alguns casos ligações covalentes como as pontes de sulfeto. Na proteína monomérica, ou seja, aquela que apresenta apenas uma cadeia polipeptídica, a estrutura terciária corresponderá ao maior nível estrutural da proteína, além de conferir a estas proteínas sua atividade biológica (ALBERTS et al., 2005).

As estruturas quaternárias podem ser definidas quando as proteínas apresentam duas ou mais cadeias polipeptídicas. A estrutura quaternária é o último nível estrutural da proteína. Esta estrutura é caracterizada pela interação de cadeias laterais de aminoácidos de cadeias polipeptídicas diferentes (ALBERTS et al., 2005).

3.2.1 Ponto isoelétrico da proteína

A carga elétrica total de uma proteína é dada pelo somatório das cargas dos radicais (R) dos aminoácidos, as quais dependem, por sua vez, dos pKas e do pH do

meio (BOBBIO e BOBBIO, 2003). No entanto, as cadeias laterais de proteína podem assumir diferentes cargas eletrostáticas, dependendo das condições que as proteínas do músculo de pescado, por exemplo, são submetidos (GEHRING et al., 2011).

O ponto isoelétrico (pI) depende do tipo de matéria-prima, mas para um grande número de proteínas encontra-se entre pHs 3,5 e 6,5. No pI, as proteínas apresentam um número de R ácidos desprotonados (COO^-) igual ao número de R básicos protonados (NH_3^+), fazendo com que as proteínas formem agregados e precipitem. Desta forma, as proteínas apresentarão carga líquida positiva em pH menor que o pI e carga líquida negativa em pH maior que o pI (SGARBIERI, 1996).

A solubilidade das proteínas é uma propriedade física e funcional muito importante. O pH afeta a densidade e a distribuição de cargas elétricas na molécula da proteína na qual em determinado pH (ponto isoelétrico) a proteína apresentará um mínimo de solubilidade (SGARBIERI, 1996). A solubilidade da proteína depende não apenas das propriedades físico-químicas da molécula, mas também do pH, da força iônica, da temperatura e do tipo do solvente (ORDÓÑEZ, 2005).

O conhecimento das características da solubilidade protéica é muito útil na seleção das condições ótimas para extração das proteínas de fontes naturais. A solubilidade, talvez, seja o índice mais prático para a determinação da extensão de desnaturação de uma proteína (KINSELLA, 1976). A solubilidade das proteínas aumenta com a temperatura (de 0 a 40°C). Acima disto, a maioria das proteínas tendem à desnaturar o que implica na perda da solubilidade (ORDÓÑEZ, 2005).

3.2.2 Isolamento das proteínas de pescado

A solubilização e precipitação isoelétrica (SPI) das proteínas do músculo de pescado, com a eliminação simultânea de lipídeos foi proposto por Hultin e Kelleher (1999). Como continuação, juntando com trabalhos anteriores (MEINKE e MATTIL, 1973), várias instituições de pesquisa começaram o estudo sobre IPP a partir destes (GEHRING et al., 2011).

Os isolados protéicos, geralmente, são obtidos por extração por via química (ácida ou alcalina), a partir de subprodutos, músculo ou de pescado inteiro. Sathivel (2003) estudou um procedimento para obtenção de um isolado protéico de pescado, através de um método de extração química alcalina com posterior precipitação isoelétrica. Esse tipo de processo possui efeito primeiramente sobre as proteínas, enquanto que para carboidratos e lipídios o mesmo não exerce efeitos. Em condições

extremas de acidez ou alcalinidade, ocorrem excessos de cargas positivas ou negativas na solução, que podem levá-los à uma repulsão, e desta forma interações entre a proteína e a água, solubilizando-as (NOLSOE e HUNDELAND, 2008).

Segundo Kristinsson e Liang (2006), materiais indesejáveis como a pele, ossos, microrganismos, lipídeos de membrana, e outros resíduos são removidos durante a primeira etapa de centrifugação, embora os ossos possam ser removidos durante a desossa mecânica. Nos processos de solubilização ácida ou alcalina, quando o músculo é submetido a extremos de pH, as proteínas são parcialmente desdobradas. Desta forma, ocorrem alterações na parte estrutural e conformacional das proteínas, as quais conduzem a diferentes propriedades quando recuperadas (KRISTINSSON e HULTIN, 2003).

Estudos afirmam que o processamento do isolado protéico de pescado em pH alcalino, permite a recuperação de proteínas com propriedades funcionais melhores, entre elas textura, gelificação e cor (brancura). Apesar de a solubilização ácida demonstrar um rendimento superior de recuperação protéica, a solubilização em pH alcalino resulta em características melhores (JAFARPOUR e GORCZYCA, 2008).

A recuperação de proteínas em isolados protéicos é relatada na literatura em teores entre 42 e 90%. Esta diferença encontrada pode ser atribuída a diferentes métodos utilizados para determinação de proteínas, temperatura, força centrífuga utilizada para separação e uma relativa concentração de proteínas sarcoplasmáticas solúveis em água entre outros. As proteínas sarcoplasmáticas são apenas parcialmente recuperadas no isolado protéico (NOLSOE e UNDELAND, 2009; TASKAYA et al., 2009; CHEN et al., 2007).

A recuperação e alteração de proteínas presentes no músculo ou em subproduto derivados da industrialização de pescado possibilitam a utilização destes como inovação tecnológica. Estes processos são uma alternativa de uso, economicamente e ecologicamente viáveis, pois os mesmos não serão descartados no meio ambiente (MARTINS, 2009).

3.3 Filmes e coberturas comestíveis e/ou biodegradáveis

Nos últimas décadas, coberturas e filmes comestíveis e/ou biodegradáveis têm recebido interesse na indústria de alimentos devido às vantagens que os diferenciam das embalagens convencionais. Em adição a sua compatibilidade com o meio ambiente e a maior segurança dos alimentos, que pode ser alcançada pela

incorporação de agentes ativos no filme (BOTREL, 2007). O caráter comestível e/ou biodegradável e o aumento da segurança dos alimentos são os três principais benefícios dos filmes. (LIMPAN et al., 2010).

Os filmes e coberturas de polímeros naturais podem ser definidos como camadas finas e contínuas formadas ou depositadas diretamente sobre os alimentos a partir de materiais biodegradáveis e/ou comestíveis dependendo dos constituintes utilizados para sua elaboração e do tipo e da concentração dos componentes empregados. Estes materiais, além de oferecer uma barreira seletiva contra a transmissão de gases, vapores e solutos, agem promovendo proteção mecânica. As coberturas são aplicadas diretamente sobre a superfície dos alimentos, enquanto os filmes possuem a capacidade de formar estruturas próprias independentes e depois aplicadas nos produtos como envoltório, entre outros (FAKHOURI et al., 2007; FERREIRA, 2006) a Figura 4, apresenta um filme biodegradável.



Figura 4 - Filme biodegradável

Fonte: (BODINI, 2011)

A elaboração de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis deve incluir pelo menos um componente capaz de formar uma matriz adequada, contínua, coesa e aderente. Tal formulação é constituída de um agente formador de filme (macromolécula), solvente (água, etanol, outros), plastificante (glicerol, sorbitol, outros), agente ajustador de pH (ácido acético, hidróxido de sódio, outros) (BERTAN, 2003). Um dos processos mais amplamente utilizados na elaboração de filmes é o

casting, que compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula e aditivos, a aplicação dessa solução num suporte adequado, seguida de secagem em condições estritamente controladas (VICENTINI, 2003).

Os componentes macromoleculares podem ser classificados em: polissacarídeos, lipídeos e proteínas. Entre os polissacarídeos estudados destaca-se o amido proveniente de diversas fontes (milho, amaranto, farelo de arroz, fécula de mandioca), a celulose e seus derivados (metilcelulose) e os polissacarídeos secretados por microrganismos, alginatos, pectina e carragena (FERREIRA et al., 2009). Entre os lipídeos utilizados como componentes ou formadores de filmes e coberturas estão as ceras (abelha e carnaúba) e os ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico, linoléico) entre outros (BODINI, 2011; MORILLON, et al., 2002; GARCÍA et al., 2000). Entre as proteínas estudadas estão o glúten do trigo, as proteínas de soja, as proteínas de leite, como a caseína, e do soro de leite, a zeína de milho, o colágeno, a albumina de ovo, a gelatina e as proteínas miofibrilares de pescado e carne bovina (GUERRERO et al., 2011; TONGNUANCHAN et al., 2011; SOBRAL et al., 2001).

Longares et al., (2005) afirmaram que os polissacarídeos (gomas vegetais, amidos, celulose entre outros) apresentam boas propriedades para formação dos filmes. Filmes elaborados com esses componentes hidrófilos proporcionam eficiente barreira a lipídeos, mas suas propriedades como barreira a umidade são pobres.

Filmes a base de lipídios tem baixa afinidade por água, por isso são mais efetivos como barreira ao vapor de água. Os filmes a base de lipídios apresentam diferentes propriedades de barreira ao vapor de água, dependendo do potencial eletrostático que está relacionado com os grupos químicos contidos na molécula, comprimento da cadeia alifática e a presença de insaturação (MORILLON et al., 2002).

Os filmes protéicos apresentam propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água limitada, mas superiores aos formados a partir de polissacarídeos. As proteínas têm uma estrutura específica (derivada de 20 diferentes monômeros – aminoácidos) que conferem uma gama maior de propriedades funcionais e potenciais por formar ligações intra e intermoleculares diferindo nas posições, tipos e energia (CUQ et al., 1997), enquanto os polissacarídeos possuem seqüências repetidas de somente um tipo de monômero.

Geralmente os filmes protéicos apresentam boas propriedades mecânicas, sendo ideal seu uso para produtos que precisam manter a sua integridade como, por

exemplo, embalar ou recobrir produtos mais frágeis. Devido ao caráter polar da proteína, os filmes protéicos também apresentam alta barreira ao oxigênio, mas reduzida barreira ao vapor de água (HOQUE et al., 2011; GARCÍA e SOBRAL, 2005; KROCHTA et al., 1997).

Apesar das proteínas de origem vegetal serem amplamente estudadas, provavelmente devido à sua abundância e baixo custo nos países desenvolvidos, estudos indicam que as proteínas animais possuem excelente capacidade formação de filmes, especificamente as proteínas miofibrilares provenientes de carne bovina e de pescado. De modo geral, os filmes formados com essas proteínas apresentam propriedades funcionais interessantes (GARCÍA e SOBRAL, 2005; SOBRAL et al., 2004; SOUZA, 2001; MONTERREY e SOBRAL, 1998).

A probabilidade de formar ligações intermoleculares depende, principalmente, da forma da proteína (fibrosa ou globular) e das condições físico-químicas do processamento. A elevada massa molecular das proteínas fibrosas pode formar filmes com boas propriedades mecânicas, enquanto proteínas globulares ou pseudoglobular (G-actina) precisam ser desdobradas em primeiro lugar, antes da formação do filme. As proteínas miofibrilares são encontradas no músculo, compostas principalmente por miosina e actina, independentemente da fonte de proteína (mamífero ou pescado) (LACROIX e COOKSEY, 2005).

Os filmes obtidos a partir de proteínas e polissacarídeos apresentam geralmente baixa elasticidade e são quebradiços, sendo necessário o uso de plastificantes para minimizar este problema. Os plastificantes são substâncias de alto ponto de fusão e baixa volatilidade, que devem ser compatíveis com o biopolímero para garantir sua eficiência. Interagem com a interface do polímero, enfraquecendo as forças intermoleculares, dando maior mobilidade às cadeias formadoras da matriz polimérica e conseqüentemente, aumentando a flexibilidade dos filmes (AZEREDO et al., 2010; MALI et al., 2010).

Os plastificantes mais empregados na produção de filmes a base de proteínas e polissacarídeos são os polióis, tais como o glicerol e o sorbitol, que possuem boa interação com o polímero devido a sua estrutura e seu caráter hidrófilo (SHIMAZU et al., 2007). O aumento do teor de plastificantes pode levar ao aumento da permeabilidade aos gases de filmes hidrófilos, pois diminui a densidade entre as suas moléculas, facilitando a difusão dos gases através do material (MALI et al., 2010). As características dos filmes podem ser avaliadas segundo suas propriedades funcionais

e/ou físicas, com destaque para as propriedades mecânicas, propriedades de barreira (vapor de água, O₂, CO₂ e etileno), solubilidade em água, cor, opacidade, entre outras (CAGRI et al., 2004).

3.3.1 Propriedades de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis

3.3.1.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais determinam a resposta destes às influências externas, estando associadas à capacidade de desenvolver deformações reversíveis e irreversíveis e de apresentar resistência à fratura. Os testes mais utilizados para medir a força mecânica são o teste de tração, onde podem ser derivadas as propriedades de resistência a tração, alongação, módulo de elasticidade entre outros. A resistência à tração e ruptura são medidas pela força máxima de tração e de perfuração que o filme pode sustentar. A alongação é geralmente tirada do ponto de quebra, no teste de tração, sendo expressa como percentual de aumento do comprimento original da amostra (SARANTÓPOULOS, 2002).

As propriedades mecânicas, resistência à ruptura e à abrasão, dos filmes são características determinantes para a sua utilização como material de embalagem, devido ao manuseio a que estão sujeitos os produtos durante sua distribuição e comercialização. Além disso, ele deve possuir flexibilidade para se adaptar a eventuais deformações dos alimentos sem danos mecânicos (SOUZA, 2001). Segundo Gontard et al., (1996) uma alta resistência à tensão é requerida, enquanto que o valor da alongação depende do tipo de aplicação do filme, pois para manter a sua integridade e as propriedades de barreira, um filme deve tolerar a tensão normal encontrada durante a sua aplicação, além do transporte e manuseio.

As propriedades mecânicas dos filmes ou coberturas dependem da natureza da solução filmogênica, utilizada, bem como da coesão estrutural deste. Em filmes à base de proteína, o grau de coesão dependerá da aptidão da proteína para formar fortes e/ou numerosas ligações a nível molecular, das interações entre as proteínas e os demais componentes (solvente, plastificantes, lipídeos e outros aditivos dispersos no meio da matriz); do processo de obtenção e do processo de eliminação do solvente (secagem) (CHAMBI, 2004).

3.3.1.2 Propriedades de barreira

Os filmes devem proteger o produto de danos físicos e da ação de gases, luzes, vapor de água e odores. Os filmes devem também constituir uma barreira que impeça ou dificulte o contato entre o ambiente externo e o produto em seu interior (SARANTÓPOULOS, 2002). Dentre as propriedades de barreira, a permeabilidade ao vapor de água é a mais discutida na literatura. A migração de vapor de água é um dos principais fatores de alteração da qualidade sensorial, características microbiológicas, físico-químicas e organolépticas bem como da estabilidade de estocagem dos alimentos (CHEN, 1995).

A permeabilidade ao vapor de água é definida pela taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área através do filme, de espessura conhecida, induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas, de temperatura e umidade relativa especificada (ASTM, 1995). Em filmes elaborados à base de polímeros hidrófilos, essa propriedade será influenciada pelas características intrínsecas do material, pelo teor do plastificante e pelas condições ambientais de umidade relativa e temperatura às quais se encontram expostos (MÜLLER et al., 2008). Todavia, a característica hidrófila é responsável pela baixa permeabilidade a gases (O_2 e CO_2), quando estes filmes são acondicionados a baixa umidade relativa (VICENTINI, 2003).

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) das proteínas miofibrilares de pescado é relativamente alta devido à sua natureza hidrófila (CUQ et al., 1997). Contudo, a maioria possui menor PVA em comparação a filmes de outros materiais. Um material pode ser considerado de alta barreira ao vapor de água, quando apresenta uma taxa de permeabilidade menor que $8 \text{ g mm (kPa m}^2\text{dia)}^{-1}$ e de altíssima barreira, quando menor que $0,8 \text{ gmm (kPa m}^2 \text{ dia)}^{-1}$ (GARCIA et al., 1989). Muitos compostos utilizados para formar filmes, entre eles polissacarídeos e proteínas apresentam baixa barreira a umidade (KOWALCZYK e BARANIAK, 2011; GONTARD e GUILBERT, 1996).

A permeabilidade ao oxigênio da proteína miofibrilar é altamente depende da umidade relativa (UR) e atividade de água (A_w). Em condições de umidade acentuada o filme perde sua eficiência em relação a barreira ao oxigênio. Esta é uma consideração importante, pois os filmes são normalmente utilizados em condições úmidas (LACROIX e COOKSEY, 2005). Materiais sintéticos geralmente apresentam baixa permeabilidade a gases, tal como o polietileno de baixa densidade, que

apresentava valores de $2,16 \cdot 10^{-11}$ para o O_2 e $9,45 \cdot 10^{-11}$ ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) para CO_2 (CUQ et al., 1995).

3.3.1.3 Propriedades ópticas: cor e opacidade

Dentre as propriedades ópticas dos filmes para aplicação em embalagem, destacam-se a cor e a transparência (opacidade). A cor pode ser considerada um importante parâmetro de caracterização dos filmes, pois está associada com a matéria-prima utilizada e processo de elaboração dos mesmos (VICENTINI, 2003). Oliveira et al. (1996) afirmaram que é desejável que as embalagens apresentem elevado brilho e alta transparência, para a apresentação dos produtos. Contudo, para o acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz a proteção contra incidência de luz se faz necessária. Portanto, a cor deve ser determinada, mas não é fator limitante para o uso. Um objeto é dito transparente quando a luz incidente o atravessa com o mínimo de absorção ou reflexão. Todavia, um objeto opaco, absorve e/ou reflete toda a luz incidente nele, sem que ocorra alguma transmissão (VICENTINI, 2003).

3.3.1.4 Solubilidade

A solubilidade em água é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis em relação ao seu emprego, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto (PÉREZ-GAGO e KROCHTA, 2001). A obtenção de filmes com boas propriedades de barreira ao vapor de água, isto é, com baixa permeabilidade dentro de uma grande faixa de umidade relativa, implica na utilização de um material de baixa solubilidade em água, ou seja, de caráter mais hidrofóbico (MANAB et al., 2011).

3.3.1.5 Espessura

A espessura do filme é característica física importante, pois ao utilizá-lo como embalagem deve se considerar o tipo, volume e peso do alimento a armazenado. A espessura do filme, independentemente da técnica de elaboração, deve ser homogênea, pois pode acarretar problemas de conservação e mecânicos (PÉREZ-GAGO e KROCHTA, 2001). Segundo Embuscado e Huber (2009), geralmente os filmes biodegradáveis apresentam espessura menores ou iguais que 0,300 mm.

3.4 Filmes antimicrobianos

Devido a constante preocupação em se prevenir da deterioração química e, principalmente, microbiológica dos alimentos (CHEN et al., 1995), o interesse em embalagens ativas tem aumentado, pois além da preservação de alimentos, este tipo de sistema pode apresentar funcionalidade adicional como suporte de substâncias antioxidantes e antimicrobianas. Desta forma, a incorporação de compostos antimicrobianos em filmes biodegradáveis promoveria um novo meio para a melhoria da segurança e da vida útil dos alimentos (CAGRI et al., 2001).

Os filmes antimicrobianos são uma forma de embalagem ativa que pode aumentar a vida útil dos produtos e fornecer segurança aos consumidores. Este tipo de embalagem visa reduzir, inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos (OJAGH et al., 2010).

O requisito necessário para o funcionamento da embalagem antimicrobiana é o intenso contato com o alimento, o que restringe o número de compostos a serem utilizados para sua elaboração, pois o contato não pode causar contaminação ou deixar resíduos no alimento. As embalagens antimicrobianas podem ser divididas em dois grupos: no primeiro, o agente antimicrobiano migra da embalagem para a superfície do produto. No segundo, os agentes são efetivos contra a multiplicação microbiana superficial sem a necessidade de migração para o produto (VERMEIREN et al., 2002).

Deve-se considerar na seleção do agente antimicrobiano seu mecanismo de inibição, características físico-químicas, cinéticas de migração e de difusão do agente no alimento, tipo e população de microrganismos, fisiologia do microrganismo-alvo, processo de fabricação do material de embalagem, processabilidade do material de embalagem e aspectos relacionados à legislação (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004). Os agentes antimicrobianos podem ser compostos naturais ou sintéticos e são incorporados aos mais diferentes tipos de materiais como o plástico, papel, filme, fibras têxteis entre outros.

Vêm sendo realizadas pesquisas com o objetivo de incorporar diferentes substâncias antimicrobianas a diferentes suportes poliméricos (RAMOS et al., 2012; BROUMAND et al., 2011; MANAB et al., 2011; ZINOVIADOU et al., 2010; GROWER et al., 2004) para obter filmes ativos. As substâncias antimicrobianas utilizadas no desenvolvimento de filmes ativos devem estar aprovadas para o contato com os alimentos. Assim, substâncias Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) tem

sido incorporadas em polímeros para a produção de embalagens antimicrobianas, como a nisina (MELO, 2003), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (GUÇBILMEZ et al., 2007), o ácido sórbico (MANAB et al., 2011; CAGRI et al., 2001), ácido benzóico e ácido propiônico (MANAB et al., 2011), sorbato de potássio (TURE et al., 2012) entre outros.

Os ácidos orgânicos merecem destaque, por possuírem maior solubilidade, baixa interferência no sabor e baixos níveis de toxicidade. Desta forma, ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como ácido acético, benzóico, cítrico, propiônico e sórbico são largamente utilizados como conservantes ou acidulantes (RAMOS et al., 2012; MANI-LÓPEZ et al., 2011; CAGRI et al., 2004; CAGRI et al., 2001).

Limjaroen et al., (2003) observaram o efeito antimicrobiano do ácido sórbico sobre a *Listeria monocytogenes* em filmes de copolímero de cloreto de polivinilideno, assim como a melhor distribuição desta substância na estrutura polimérica em relação ao sorbato de potássio e nisina. Estudos de Cagri et al. (2001) verificaram que a adição do ácido para-aminobenzóico (1,50%) em filmes à base de isolado protéico de soro de leite possuía efeito antimicrobiano sobre *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Typhimurium.

Ao serem incorporadas substâncias antimicrobianas, em materiais poliméricos, podem-se afetar as propriedades físicas (QUINTAVALA e VICINI, 2002) e mecânicas (HAN, 2000) dos filmes obtidos. Segundo Appendini e Hotchkiss (2003), as mudanças nestas propriedades são específicas para cada combinação antimicrobiano-polímero. Quando filmes à base de isolado protéico de soro de leite foram incorporados com 0,50%, 0,75%, 1,00% e 1,50% de ácido sórbico ou de ácido para-aminobenzóico, houve decréscimo na propriedade de resistência à tração, porém não houve mudança significativa na espessura em relação ao filme controle (CAGRI et al., 2001).

Os filmes ativos estão sendo utilizados em produtos cárneos, queijos, massas frescas e pães entre outros (PINTADO et al., 2012; ZINOVIADOU et al., 2009; SILVEIRA et al., 2007; SARANTÓPOULOS et al., 1996). Cada alimento tem seu próprio mecanismo de degradação, que varia em função da sua composição e processamento. Portanto, diversos processos podem ser observados no interior das embalagens que vão depender das características intrínsecas do alimento e da forma como ele interage com o ambiente que o cerca.

3.4.1 Mecanismo de ação dos antimicrobianos

De maneira geral, certas características da célula podem sugerir possíveis locais de ação de um agente antimicrobiano. A célula dos microrganismos contém muitas enzimas responsáveis pelos processos metabólicos; uma membrana semipermeável (membrana citoplasmática) que mantém a integridade do conteúdo celular, controlando seletivamente o transporte de substâncias entre a célula e seu meio, além de ser, o local de algumas reações enzimáticas. A parede celular proporciona uma cobertura à bactéria, participando de certos processos fisiológicos. Uma lesão em qualquer desses níveis pode iniciar alterações que levam a morte da célula (MANI-LÓPEZ et al., 2011; JAY, 2005).

A parede celular protege a integridade fisiológica da bactéria e suporta a pressão osmótica interna (maior nas bactérias Gram-positiva). A ausência desta estrutura proporcionaria a destruição do microrganismo, induzida pelo gradiente osmótico acentuado entre o meio e o citoplasma bacteriano. Existe muitos sítios possíveis de lesão celular, podendo esta ser causada por um ou mais entre uma variedade de agentes (PELCZAR et al., 1980). Em bactérias Gram-negativas, a lise osmótica ocasionada pela inibição da síntese da parede é lenta, devido a menor pressão osmótica nestes microrganismos e a diferença nos constituintes da parede celular (FLUHR e DEGITZ, 2010).

A composição química da parede celular das bactérias Gram-positivas inclui peptoglicano, carboidratos, ácido teóico e ribonucleato de magnésio. Os processos de síntese e de lise da parede celular das bactérias em crescimento estão continuamente em equilíbrio. A inibição de algum constituinte da parede celular faz com que ocorra um desequilíbrio e a ação das autolisinas destroem as bactérias (HARRIS e THORARENSEN, 2004).

Os antimicrobianos podem agir sobre bactérias patogênicas susceptíveis a partir da interrupção de sua multiplicação (efeito bacteriostático) e/ou indução da morte bacteriana (efeito bactericida, bacteriolítico) (HARRIS e THORARENSEN, 2004). Estes efeitos ocorrem através da interferência sobre as vias metabólicas desses agentes de toxinfecções que podem alterar desde a permeabilidade (membrana externa) até os processos de síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) das bactérias (FLUHR e DEGITZ, 2010).

Alguns antibacterianos são inativos frente a cepas Gram-negativas, pois não conseguem ultrapassar a membrana externa destas bactérias, pois estas dificultam a

difusão destes para o seu alvo no interior celular ao qual se constitui em um fator primordial para a ação de antibióticos, sanitizantes, entre outros. A composição da parede celular depende do tipo de bactéria e origina diferenças de permeabilidade aos compostos, influenciando diretamente na ação do antibacteriano. A estrutura química e o tamanho molecular do antibacteriano também determinam e influenciam seu modo de ação (BOMONO e SZABO, 2006).

A membrana citoplasmática preserva a integridade dos constituintes celulares, além de garantir o transporte seletivo de nutrientes para o interior da bactéria. A lesão na mesma resulta na inibição da multiplicação ou morte bacteriana. A atividade antimicrobiana de alguns detergentes sintéticos, compostos quaternário de amônio entre outros é atribuída ao seu efeito sobre a permeabilidade celular. Estes compostos destroem a permeabilidade seletiva da membrana possibilitando o vazamento de constituintes celulares (PELCZAR et al., 1980).

Os microrganismos Gram-positivos apresentam uma membrana celular similar a dos eucariontes cuja única diferença é a ausência de colesterol em sua constituição. Neste microrganismo, a membrana fica situada logo abaixo da parede celular, criando um espaço na face externa da membrana, denominado espaço periplasmático. Nos microrganismos Gram-negativos existem duas membranas, uma na face externa da parede celular e outra na face interna. Assim drogas com baixa lipossolubilidade têm maior dificuldade em agir sobre as bactérias Gram-negativas por causa da membrana externa. Contudo, existem proteínas na membrana externa das bactérias Gram-negativas, denominadas porinas, que podem facilitar a passagem de substâncias para o espaço periplasmático (FLUHR e DEGITZ, 2010). Alguns antibacterianos podem comprometer o metabolismo da célula, pois estes se ligam aos constituintes normais da membrana causando uma desorganização funcional que alteram sua permeabilidade (BOMONO e SZABO, 2006).

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos (acético, benzóico, sórbico) é atribuída à sua forma não dissociada, portanto, o pKa é utilizado na predição de sua eficiência no alimento em determinado pH. Os valores do pKa (pH no qual 50% da molécula se encontra na forma dissociada) da maioria dos ácidos encontram-se na faixa de pH entre 3,0 e 5,0, portanto a concentração da forma não dissociada aumenta com a elevação da acidez do alimento (ARAÚJO, 1995). A fração não dissociada de certos ácidos orgânicos (sórbico, benzóico e propiônico) afeta os microrganismos por ser rapidamente solubilizada na membrana celular, que é um fluido lipoprotéico. Esses

ácidos, difundidos através da membrana, ionizam no interior da célula, acidificando o meio intracelular.

Como os demais ácidos orgânicos, o ácido sórbico apresenta atividade antimicrobiana em forma não dissociada, sendo geralmente ineficaz em alimentos com $\text{pH} > 6,5$. O pKa do ácido sórbico é 4,80, e em $\text{pH} 4,0$ cerca de 86% do composto não está dissociado, enquanto que em $\text{pH} 6,0$ somente 6,0% encontra-se nessa forma (JAY, 2005). Segundo Jay (2005), em $\text{pH} 4,0$; 60% do ácido benzóico estão na forma não dissociada e, em $\text{pH} 6,0$, apenas 1,50%, restringindo a atuação em produtos de elevada acidez. Ao entrar na célula viva por transporte passivo, devido à permeabilidade da membrana dos microrganismos ao conservador, o ácido não dissociado termina se dissociando ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$) devido o pH interno da célula ser mais elevado que o pKa do ácido. A diminuição do pH intracelular resulta no enfraquecimento do gradiente da membrana, que representa o potencial eletroquímico empregado pela célula para transporte ativo de certos compostos como os aminoácidos, o que afeta o transporte de nutrientes (BRUL e COOTE, 1999).

3.5 Microrganismos associados a doenças transmitidas por alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um dos problemas de saúde pública mais frequentes do mundo contemporâneo. São causadas por agentes etiológicos, principalmente microrganismos, os quais penetram no organismo humano pela ingestão de água e de alimentos contaminados (AMSON et al., 2006).

Algumas bactérias são preocupações constantes para a indústria de alimentos, pois veiculam as DTA e afetam as propriedades organolépticas dos alimentos, tornando-os desagradáveis ao consumo. Entre elas podemos citar as Gram-positivas e Gram-negativas que se diferenciam pela composição da parede celular. A parede celular das bactérias é responsável pela manutenção da forma bacteriana, desempenhando papel importante na divisão celular. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam diferenças marcantes quanto à composição da parede celular. A camada composta de peptidoglicano confere rigidez à parede celular, nas bactérias Gram-positivas atinge de 15 a 50 % da massa seca da célula e nas Gram-negativas não ultrapassa 5% (RANG et al., 1997).

O perfil epidemiológico das DTA no Brasil é pouco conhecido. Apenas alguns estados ou municípios dispõem de estatísticas e dados publicados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais freqüentemente implicados, população de

maior risco e fatores contribuintes. De acordo com os dados disponíveis de surtos, esses apontam como agentes mais freqüentes os de origem bacteriana e dentre eles, *Salmonella spp*, *E. coli*, *S. aureus* entre outros (BRASIL, 2010).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) a respeito dos surtos registrados, entre 1999 a 2008, demonstraram que 6.062 surtos de DTA foram registrados, com acometimento de 117.330 pessoas (mediana de sete doentes por surto) e 64 óbitos. Verificou-se que a *Salmonella spp.* foi responsável por 1.275 surtos, seguida pelo *S. aureus* responsável por 600 surtos (BRASIL, 2010).

3.5.1 *Escherichia coli* O157:H7

As bactérias do gênero *Escherichia* são microrganismos que pertencem a família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes Gram-negativos, habitam o trato intestinal dos animais e do homem, móveis, não formadores de endósporos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás em caldo EC, em 24 horas a 44,5°C. As principais características que distinguem a *E. coli* O157:H7 dos demais sorovares de *E. coli* são o crescimento pobre ou nulo a 44°C. a temperatura máxima de crescimento em caldo EC de aproximadamente 42°C, além de tolerar menores concentrações de sais biliares (JAY, 2005).

Há uma ampla variedade de alimentos envolvidos nos surtos causados por *E. coli* O157:H7 como a carne bovina mal cozida, produtos derivados à base de carne, leite cru e vegetais entre outros. Porém, o principal deles é a carne bovina, uma vez que o trato gastrointestinal do bovino funciona como reservatório desses microrganismos. O bovino excreta o patógeno pelas fezes e desta forma contamina o ambiente, água e alimentos. Este microrganismo pode ser disseminado através do contato direto pessoa-pessoa, através da transmissão fecal-oral e pelo contato direto com bovinos (RIVAS et al., 2008). A dose infectante, segundo dados de surtos, pode ser tão baixa quanto 10 células e a maioria dos surtos infecciosos relatados causados por *E. coli* entero-hemorrágica foi causada pela linhagem O157:H7 (FORSYTHE, 2002).

3.5.2 *Listeria monocytogenes*

Os microrganismos do gênero *Listeria* são bastonetes gram-positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos, móveis à temperatura de 10 a 25°C. O gênero

Listeria é vastamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no solo, fezes de animais, vegetação e água entre outros (JAY, 2005).

De todas as espécies de *Listeria*, a *Listeria monocytogenes* é a de maior importância para a microbiologia de alimentos, pois é patogêna. Acredita-se que a dose requerida para causar doenças nos indivíduos seja de 100-1000 células (WARRIENER e NAMVAR, 2009). A importância de *L. monocytogenes* para os alimentos é devida à sua capacidade de multiplicação em uma faixa ampla de temperatura, de 1 a 45°C, e de pH 4,1 a 9,6 podendo sobreviver nos alimentos por um longo período (JAY, 2005).

Rantsiou et al. (2011) ressaltaram que a *L. monocytogenes* passou a chamar a atenção como um patógeno veiculado por alimentos quando a refrigeração se estabeleceu como um processo de conservação em toda a cadeia de alimentos, com o objetivo de prolongar a vida útil dos alimentos. Os principais alimentos envolvidos em surtos de listeriose são os produtos cárneos e frutos do mar prontos para o consumo e os queijos pastosos, o que é atribuído a suas características intrínsecas, como o alto teor protéico, moderada atividade de água e poucos microrganismos competidores (WARRINER e NAMVAR, 2009).

3.5.3 *Salmonella* Enteritidis

O gênero *Salmonella* pertence à família das enterobactérias, é um bacilo gram-negativo, aeróbio e anaeróbio facultativo, não formador de esporo e móvel. A temperatura ótima para a multiplicação é de 37°C, mas se multiplicam entre 5 e 45°C. O pH ideal para a multiplicação é 7,0 mas se multiolica entre 4 e 9 (JAY, 2005).

A *Salmonella* é responsável por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas, sendo reconhecida como um dos principais agentes de infecção de origem alimentar em diversos países (LACONHA et al., 2000). Nas últimas décadas, aumentou a incidência de salmonelose humana causada pelo sorovar *Enteritidis*. Os veículos mais freqüentes de contaminação têm sido os ovos e a carne de aves e seus derivados. Em geral, a manipulação inadequada durante o preparo de alimentos é um fator importante de contaminação cruzada (TÉO, 2002). Segundo Okamura et al. (2001), a capacidade de transmissão transovariana e horizontal de *S. Enteritidis* para ovos resultou em ampla disseminação e persistência desse sorovar na indústria avícola.

3.5.4 *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, apresentam forma de coco e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. São bactérias Gram-positivas, com diâmetro entre 0,50 a 1,5 µm, imóveis e não formam esporos (FRANCO e LADGRAF, 2008).

O *Staphylococcus* spp. possui uma distribuição ubiqüitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região nasofaríngea de mamíferos e aves (ATANASSOVA et al., 2001). Este gênero é composto por 38 espécies e 24 subespécies, sendo algumas frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, tanto em seres humanos como em animais (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004). Dentre estas espécies, destaca-se *Staphylococcus aureus* como a mais envolvida em doenças em seres humanos.

O *S. aureus* tem sido um microrganismo frequentemente envolvido em surtos de toxiose alimentar, está muito associado à manipulação inadequada dos alimentos, uma vez que é comumente encontrado na pele, mucosas do trato respiratório superior e no intestino de humanos (WANG et al., 2007). Diversas cepas de *S. aureus* podem produzir enterotoxinas, desde que ocorram condições apropriadas, como por exemplo, temperaturas entre 10 e 46°C. Essas enterotoxinas são termorresistentes, ou seja, podem resistir aos processos de aquecimento, ao contrário das células bacterianas vegetativas que são eliminadas quando aquecidas acima de 60° C (JAY, 2005).

Este patógeno pode se multiplicar sob condições de alta pressão osmótica e baixa umidade, sua temperatura ótima está entre 30 a 37 °C, mas pode se multiplicar de 7 a 48,5°C, seu pH ótimo é de 7 a 7,5, mas é estável de 4,2 a 9,3 o que permite seu desenvolvimento em uma variedade de alimentos. A formação de biofilme deste microrganismo é um das principais causas de infecções associadas à biomateriais como catéteres, próteses, válvulas cardíacas e lentes de contato, entre outras. Este tipo de infecções geralmente não responde a antibióticos convencionais, o que requer a remoção do material infectado (LOIR et al., 2003).

3.6 Carne bovina

O Brasil é o segundo maior produtor e lidera o ranking dos países exportadores mundiais de carne bovina (ABIEC, 2011). A carne bovina é um dos principais veículos

de doenças de origem alimentar, também é sujeita a deterioração durante o armazenamento como todos os alimentos (CARDENAS et al., 2008). O Brasil é o quarto maior consumidor per capita de carne bovina, com consumo médio de 37 quilos por pessoa/ano nos últimos 15 anos, atrás dos Estados Unidos, Argentina e Uruguai (ABIEC, 2011). Devido a estes fatores, a qualidade sensorial e, principalmente, microbiológica desperta interesse, pois a carne bovina possui grande importância no cenário mundial.

Nenhum alimento é isento totalmente de microrganismos, a não ser que tenha sido esterilizado, como é o caso de alimentos enlatados ou em formulações especiais. Alimentos crus de origem animal estão naturalmente contaminados com microrganismos, alguns dos quais podem causar doença no homem, caso o alimento não seja apropriadamente tratado antes de seu consumo (FRANCO et al., 2010).

Devido as suas características intrínsecas, a carne é um excelente substrato para a multiplicação de inúmeros microrganismos, sendo muitos os fatores que podem favorecer esse desenvolvimento microbiano. A carne está exposta às contaminações de natureza microbiana em todas as fases de seu processamento, particularmente nas operações de maior manipulação e sempre que não são tomados os cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Fabricação (BPF) (SOFOS et al., 2008; JAY, 2005; PARDI et al., 2001).

Entre os microrganismos patogênicos encontrados na carne bovina, encontram-se *Salmonella spp*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* entre outros (FRANCO et al., 2010). O grande rebanho bovino nacional, a importação de animais para melhoramento genético (de países com ocorrência do sorotipo O157:H7), assim como o hábito de consumo de carne, leite e derivados de origem bovina sem tratamento térmico adequado, são um dos fatores que favorecem a manutenção de animais infectados e a veiculação de doença transmitidas por alimentos por *E. coli* O157:H7 no país (RIBEIRO et al., 1999).

Uma das alternativas para reduzir o número desses patógenos nos alimentos, é a aplicação de filmes ativos como embalagens. Emiroglu et al. (2010) verificaram que os filmes à base de isolado protéico de soja incorporados com óleos essenciais, possuíam atividade antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7, *E. coli* e *S. aureus*. Zinoviadou et al. (2009) em seus estudos com filmes à base de isolado protéico de soro de leite contendo óleo de orégano, verificaram que o uso deste filme como embalagem de carne bovina fresca reduziu significativamente a contagem de

Pseudomonas spp. Estes estudos despertaram o interesse no uso de filmes à base de isolado protéico de pescado incorporado com agente antimicrobiano, como embalagem ativa da carne bovina.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi dividido em dois artigos:

1. Efeito do Tratamento Térmico, Concentração de Plastificante e de Proteína nas Propriedades Físico-químicas de Filmes à Base de Isolado Protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*);
2. Propriedades Físico-químicas dos Filmes à Base de Isolado Protéico de Pescado, Incorporados com Ácidos Orgânicos e sua Ação Antimicrobiana contra Patógenos Alimentares.

ARTIGO 1
EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO, CONCENTRAÇÃO DE PLASTIFICANTE E
DE PROTEÍNA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE FILMES À BASE DE
ISOLADOS PROTÉICOS DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*)

Efeito do Tratamento Térmico, Concentração de Plastificante e de Proteína nas Propriedades Físico-químicas de Filmes à Base de Isolados Protéicos de anchoita (*Engraulis anchoita*)

RESUMO

Foi avaliado o efeito dos parâmetros: tratamento térmico (74, 82 e 90°C durante 30 minutos), concentração de glicerol (30, 35 e 40 g de glicerol.100 g⁻¹ de isolado protéico de anchoita - IPA) e concentração de isolado protéico (3,0; 3,5 e 4,0 g IPA.100 g⁻¹ solução filmogênica - SF) sobre a espessura, a solubilidade, PVA, RT, ΔE^* , Y e MEV dos filmes à base de IPA. O IPA foi avaliado quanto a sua composição proximal, aminoacídica e por calorimetria diferencial de varredura (DSC). O IPA apresentou 88,8% de proteínas e 53,3% de aminoácidos polares. Na curva de DSC foi observada a temperatura máxima de desnaturação de 62,2°C e a ΔH de 6,4 J.g⁻¹. A espessura, PVA, ΔE^* e Y dos filmes não foram afetados pelos parâmetros estudados nos experimentos. A menor solubilidade e maior RT dos filmes ocorreram em baixa concentração de IPA, glicerol e tratamento térmico. O comportamento oposto foi observado para E, onde um acréscimo nessas variáveis resultou em maior E. As superfícies dos filmes foram homogêneas, nos filmes com leve tratamento térmico.

Palavras-chave: filme, pescado, isolado protéico, propriedades e avaliação.

ABSTRACT

The effect of the parameters: heat treatment (74, 82 and 90°C for 30 minutes), the glycerol concentration (30, 35 and 40 g of glicerol.100 g⁻¹ anchovy protein isolate - API) and concentration protein isolate (3.0, 3.5 and 4.0 g API.100 g⁻¹ filmogenic solution - FS) on the thickness, solubility, WPV, TS, ΔE^* , Y and SEM of films based on API. The API was evaluated on their proximal and amino acid composition and by differential scanning calorimetry (DSC). API had 88.8% protein and 53.3% of polar amino acids. In the DSC curve was observed the maximum temperature of denaturation 62.2 °C and ΔH 6.4 J.g⁻¹. The thickness, WPV, ΔE^* and Y of the films were not affected by the parameters studied in the experiments. The lower solubility and higher TS of the films occurred in a low concentration of API, glycerol and heat treatment, but E increased with the addition of these variables. The opposite behavior is observed for E, where an increase these variables resulted in higher E. The SEM of the surfaces of the films were homogeneous, for those with mild heat treatment.

Keywords: Film, fish, protein isolate, properties and evaluation.

1. INTRODUÇÃO

Devido à preocupação mundial com a oferta de recursos naturais limitados e o impacto ambiental causado pelo uso de polímeros sintéticos, há um grande interesse no desenvolvimento de filmes biodegradáveis que atuem na função de embalagem. Estes filmes podem ser utilizados como embalagens de alimentos, reduzindo a perda de umidade, restringindo a absorção de oxigênio, diminuindo a migração de lipídeos, além de fornecer uma proteção física e ser uma alternativa para os materiais de embalagem comerciais (BOURTOOM, 2009; FERREIRA et al., 2009).

Embora os filmes possam ser desenvolvidos a partir de polissacarídeos, lipídeos e/ou proteínas, as pesquisas mais recentes destacam o desenvolvimento de filmes à base de proteína (BOURTOOM, 2009). A proteína tem sido estudada devido a sua abundância, ou à capacidade de formação de filmes (KROCHTA, 2002). As proteínas possuem uma estrutura à base de 20 monômeros diferentes, o que lhes confere uma ampla capacidade de formar ligações intermoleculares (CUQ et al., 1995). Estas podem formar ligações em posições diferentes, oferecendo um potencial para a formação de numerosas ligações (OU et al., 2005).

O uso de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas do músculo do pescado foram estudados em várias pesquisas (SOBRAL et al., 2002; TANAKA et al., 2001; SOBRAL, 2000). As proteínas miofibrilares são insolúveis em água, mas tornam-se solúveis a partir da mudança do pH da solução. Estas proteínas são capazes de formar uma matriz contínua e coesa após a secagem da solução filmogênica (CUQ et al., 1995). A anchoita (*Engraulis anchoita*) é uma espécie pelágica pertencente à família *Engraulidae* do gênero *Engraulis*, que é pouco explorada no Brasil (MADUREIRA et al., 2009; GOULAS e KONTOMINAS, 2005). São espécimes pequenos, com hábitos costeiros, amplamente distribuídos a partir da Argentina até o Rio de Janeiro, no Brasil (CASTELLO e CASTELLO, 2003).

A formação dos filmes envolve uma série de ligações químicas complexas, que são influenciadas por condições experimentais, tais como: tamanho da macromolécula, plastificante, solvente e temperatura utilizada na formação dos filmes (CHO e RHEE, 2004). A adição de agentes plastificantes é essencial na elaboração dos filmes. Eles são pequenas moléculas de baixa volatilidade, que quando adicionados a materiais poliméricos, modificam a estrutura tridimensional, diminuindo as forças de atração intermoleculares o que aumenta o volume livre e conseqüentemente a mobilidade da cadeia. Como resultado dessas mudanças, em nível de organização molecular, ocorre um aumento da extensibilidade e flexibilidade

do filme. Os plastificantes largamente utilizados em alimentos são glicerol e sorbitol (VIEIRA et al., 2011; SWAIN et al., 2004). O tratamento térmico modifica a estrutura das proteínas, causando exposições dos grupos SH e, conseqüentemente, produz ligações intra e intermoleculares, promovendo a exposição de grupos hidrofóbicos durante a secagem (PÉREZ-GAGO e KROCHTA 2001).

O uso de filmes em aplicações alimentares é condicionado por características como custo, disponibilidade, atributos funcionais da macromolécula e propriedades mecânicas (tensão, flexibilidade), propriedades ópticas (brilho e opacidade), efeito de barreira contra o fluxo de gases, resistência à água e aceitabilidade sensorial dos filmes (FALGUERA et al., 2011). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de concentrações de plastificante e de isolado protéico, assim como a temperatura do tratamento térmico utilizados na solução filmogênica sobre as propriedades de filmes à base de isolado protéico de carne separada mecanicamente de um pescado de baixo valor comercial, a anchoita (*Engraulis anchoita*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

A matéria-prima utilizada foi anchoita, espécie pelágica capturada em cruzeiros realizados pelo Navio Oceanográfico Atlântico Sul da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), na zona costeira do sul do Brasil. Esta foi armazenada a bordo do navio em gelo e água do mar (1:1) em caixas de poliestireno (GARCIA, 2007). Logo após, foi transportada para uma indústria pesqueira da cidade do Rio Grande, onde foi higienizada com água clorada a 5ppm em tambor rotativo, eviscerada e descabeçada. A partir desta, foi obtida a carne mecanicamente separada, processada em despoldadeira (HIGH TECH, HT250, Chapecó, Brasil), separando carne dos ossos e pele, na Unidade de Processamento de Pescado. A carne mecanicamente separada de anchoita (CMSA) foi armazenada à -18°C no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FURG, até processamento e análise.

2.2 Obtenção do isolado protéico de anchoita

O isolado protéico de anchoita (IPA) foi obtido por solubilização alcalina das proteínas e posterior precipitação isoelétrica segundo metodologia adaptada de Nolsoe e Undeland (2009). A Figura 5 apresenta o fluxograma de obtenção do isolado protéico de anchoita. Como agente alcalinizante foi utilizado o NaOH (1 mol L⁻¹) e acidificante o HCl (1mol L⁻¹).

Segundo o fluxograma a carne mecanicamente separada de anchoita foi homogeneizada em água destilada (1:9 p/v), em reator de aço inoxidável acoplado com banho ultratermostático (QUIMIS, 214 D2) a 4°C. Após, foi realizada a solubilização alcalina em pH 11,2 à 4°C durante 20 minutos sob agitação constante com agitador eixo-hélice (IKA, modelo RW 20DZM.n). Em seguida, foi realizada a centrifugação a 9000 x g durante 20 minutos em centrífuga (BIOSYSTEMS, MPW 350/350-R), para separação em três fases: lipídeos neutros, proteínas solúveis e insolúveis.

A fase intermediária, proteínas solúveis, foi submetida a precipitação isoelétrica das proteínas em pH 5,0 à 4°C sob agitação constante durante 20 minutos. Então, foi realizada nova centrifugação a 9000 x g durante 20 minutos para obtenção das proteínas precipitadas, reservando a fase sólida precipitada que foi desidratada em estufa com circulação de ar (QUIMIS, Q342, São Paulo, Brasil) durante 16 horas a 40°C.

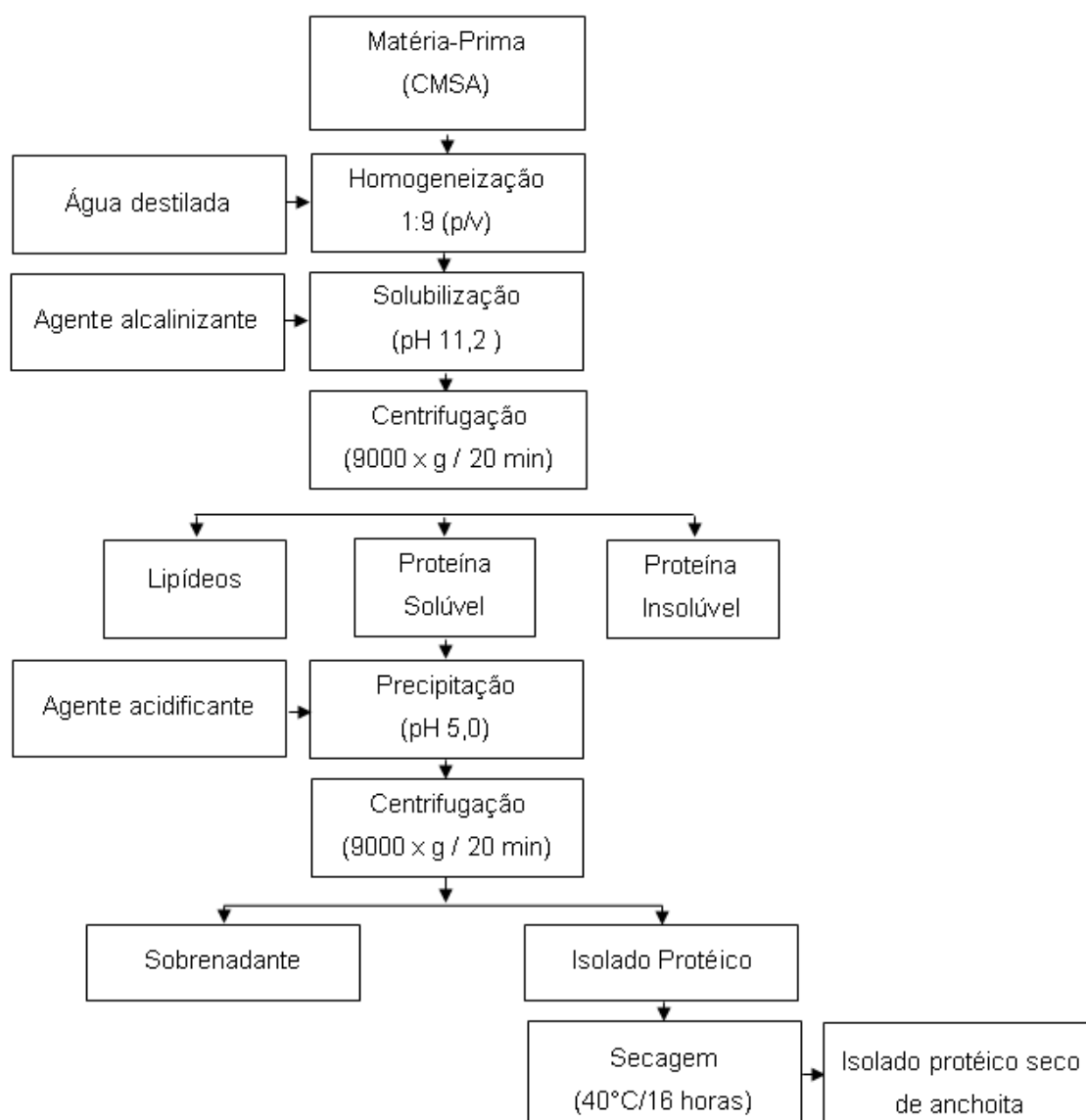


Figura 5 - Fluxograma do processo de obtenção do isolado protéico de anchoita.

O isolado protéico de anchoita assim obtido, foi triturado em moinho de facas (TECNAL, TE-645, Brasil). Então, a granulometria deste foi padronizada para 0,35 mm empregando peneiras de 42 mesh (BERTEL, Caieiras, São Paulo). Este produto foi utilizado como base na elaboração dos filmes protéicos.

2.3 Caracterização da carne mecanicamente separada e do isolado protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*)

2.3.1 Composição proximal

A composição proximal da carne mecanicamente separada e dos isolados protéicos de anchoita foi determinado segundo métodos analíticos recomendados pela AOAC (2000), com n° de 992,15; 923,03; 960,39; e 925,30; para determinação de proteína, cinzas, umidade e lipídeos, respectivamente.

2.3.2 Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos do isolado protéico de anchoita foi determinada segundo a metodologia proposta por Bidlingmeyer et al. (1984), utilizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). As amostras foram previamente hidrolisadas com HCl 6 mol l⁻¹, durante 22 horas à 110 ± 1°C.

2.3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (Differential Scanning Calorimetry) do IPA foi realizada segundo metodologia proposta por Thorarinsdottir et al. (2002) com modificações. A DSC foi realizada em calorímetro (TA Instruments, DSC-Q20, New Castle, DE, EUA) para verificar a desnaturação de proteína. Foi pesado 2,00 ± 0,01 mg de isolado protéico de anchoita em cápsulas de alumínio herméticas (TA Instruments), logo foram seladas. Como referência foi utilizada uma cápsula de alumínio hermética fechada sem amostra. A varredura foi realizada em um intervalo de 15 a 110°C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A entalpia de desnaturação (ΔH) foi calculada a partir da área do pico endotérmico observado no termograma.

2.4 Elaboração dos filmes à base de isolado protéico de anchoita

Foi realizado um planejamento fatorial de delineamento composto central (DCC) 2³ com três pontos centrais para elaboração dos filmes. Os níveis das variáveis independentes foram obtidos com base em testes preliminares. Foi estudada a melhor condição de elaboração da solução filmogênica (SF) através das variáveis: concentração de isolado protéico (IPA), concentração de glicerol e temperatura de tratamento térmico, segundo apresenta a Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis codificados das variáveis para a elaboração dos filmea à base de isolado protéico de pescada (IPA)

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
IPA (g.100 g ⁻¹ SF [*])	3,0	3,5	4,0
Glicerol (g.100 g ⁻¹ IPA ^{**})	30,0	35,0	40,0
Tratamento Térmico (°C)	74,0	82,0	90,0

*SF: solução filmogênica; **IPA: isolado protéico de anchoita.

Os filmes de IPA foram elaborados pela técnica de *casting* em condições alcalinas, como apresenta o fluxograma da Figura 6.

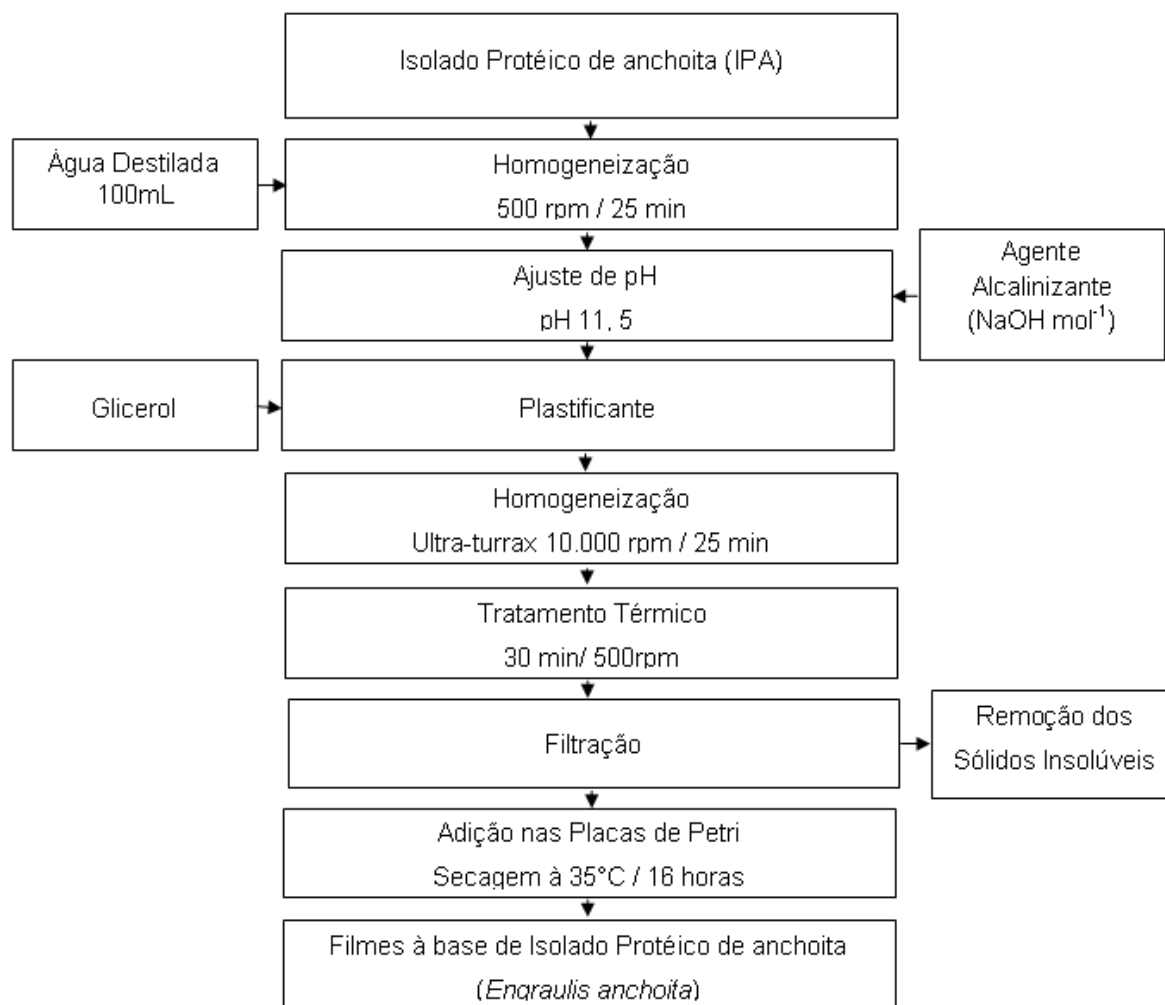


Figura 6 - Fluxograma do processo de elaboração de filmes à base de IPA

Os diferentes conteúdos de IPA foram adicionados, em reator de vidro (500 mL) acoplado com banho ultratermostático (QUIMIS, 214 D2), em 100 mL de água destilada e homogeneizados à 500 rpm com agitador de eixo-hélice (IKA, modelo RW 20DZM.n) durante 25 minutos a 25°C. Em seguida, o pH da solução filmogênica foi ajustado para 11,5 com solução de NaOH (1 mol⁻¹). Então foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol à SF e homogeneizadas em Ultra-turrax (IKA, T25 digital, Werke, Alemanha) a 10.000 rpm durante 20 minutos. A solução foi aquecida em diferentes temperaturas durante 30 min, sob agitação de 500 rpm, para desnaturar a proteína isolada da CMSA. A SF obtida foi filtrada através de um filtro de nylon para remoção de alguns constituintes não dissolvidos. Foram adicionadas 25 mL das soluções filmogênicas em placas de Petri acrílicas (9 cm de diâmetro) e logo desidratadas à 35 °C durante 16 h em estufa com circulação de ar (FANEM, 520, São Paulo, Brasil). Os filmes foram armazenados durante 48 horas a 25°C, para posterior avaliação dos mesmos.

2.5 Caracterização dos filmes

2.5.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com micrômetro digital (Insize, IP54, São Paulo, Brasil, resolução 0,0001 mm) foi determinada. A espessura final foi calculada pela média aritmética de dez medidas aleatórias sobre a superfície do filme (GONTARD et al., 1994).

2.5.2 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo metodologia proposta e adaptada Gontard et al., (1994). Três discos de cada amostra de filme, com 2 cm de diâmetro, foram previamente pesados e imersos em 50 mL de água destilada. O sistema foi mantido sob agitação a 100 rpm em incubadora shaker refrigerada (Cientec, CT-712RNT, São Paulo, Brasil) a 25°C durante 24 horas. A quantidade de matéria seca inicial e final foi determinada em estufa a 105°C até peso constante. A solubilidade do filme representou o total de matéria solúvel dissolvida em água, incluindo proteínas solúveis, água e glicerol. A solubilidade em água foi calculada pela Equação 1:

$$S (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: S é a solubilidade em água (%); m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa final da amostra (g).

5.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico da ASTM E96-95 (1995) a 25°C. O filme foi selado em uma célula com $1,58 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ de área de permeação, contendo cloreto de cálcio anidro (0% UR). A célula foi acondicionada em um dessecador, com solução saturada de cloreto de sódio (75% UR). A massa da célula foi verificada em intervalos de 24 horas, durante 48 horas. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada através da Equação 2.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \frac{L}{A \Delta P} \quad (2)$$

Onde: PVA é a permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{mm}$) ($\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$); L é a espessura inicial do filme (mm); ΔW é o ganho de massa pela célula (g); t é o tempo de incubação (dia); A é a área exposta do filme (m^2) e ΔP é a diferença de pressão parcial (kPa).

2.5.4 Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e a alongação dos filmes foram determinadas, em triplicata, segundo metodologia da ASTM D-882-91 (1996), utilizando um texturômetro TA.XT_{plus} (Stable Micro Systems). As amostras foram cortadas em forma de retângulos (80 x 25 mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50 mm e velocidade de tração de $0,8 \text{ mm s}^{-1}$. A resistência a tração foi calculada através da Equação 3 e a alongação com a Equação 4.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad (3) \quad E = \frac{d_r - d_0}{d_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: RT é a resistência a tração (MPa); F_m é a força máxima no momento da ruptura (N); A é a área da seção transversal do filme (m^2); E é a alongação (%); d_0 é a separação inicial entre as garras (cm) e d_r é a separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

2.5.6 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi expressa como diferença de cor (ΔE^*) utilizando colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japão), operando com D_{65} (luz do dia) usando os parâmetros de cor CIELab, segundo Sobral et al., (2001). Os parâmetros a^* , b^* e L^* dos filmes foram determinados sobrepondo-se os filmes sobre um padrão branco e a diferença de cor foi expressa segundo a Equação 5.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad (5)$$

Onde $\Delta L^* = L^*_{\text{padrão}} - L^*_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{padrão}} - a^*_{\text{amostra}}$; $\Delta b^* = b^*_{\text{padrão}} - b^*_{\text{amostra}}$

A opacidade foi determinada segundo Sobral (2000) utilizando-se o programa do equipamento. Segundo este método, a opacidade é calculada como a relação entre a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto (Y_p) e sobre o padrão branco (Y_b), segundo a Equação 6.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (6)$$

2.5.7 Microestrutura dos filmes

Os estudos da microestrutura dos filmes foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através da microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6060, Japão) operado a 10 kV. As amostras dos filmes foram colocadas em suporte de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro (Sputter Coater, SCDO50) para melhorar a condutibilidade. As fotografias foram tiradas com 2000x de ampliação.

2.6 Planejamento Experimental

Os experimentos foram realizados utilizando um planejamento fatorial de delineamento composto central (DCC) 2^3 com três pontos centrais. As variáveis estudadas foram concentração de isolado protéico de anchoita, de glicerol e tratamento térmico. Os experimentos (1 à 11) foram analisados pela Metodologia de Superfície de Contorno utilizando o Programa Statistica (versão 6.0, por StatSoft, Inc., Tulsa, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da carne mecanicamente separada e do isolado protéico de anchoita

3.1.2 Composição proximal

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos experimentalmente da composição proximal da carne mecanicamente separada e do isolado protéico de anchoita.

Tabela 2 - Composição proximal da carne mecanicamente separada de anchoita (CMSA) e a composição proximal do isolado protéico de anchoita (IPA) seco a 40°C

Constituintes	CMSA (b.u) (%)	CMSA (b.s) (%)	IPA seco à 40°C (%)
Umidade	78,2 ± 0,3	-	5,5 ± 0,0
Proteínas	17,4 ± 0,2	79,8 ± 0,2	88,8 ± 0,8
Lipídeos	2,2 ± 0,4	10,2 ± 0,4	1,3 ± 0,7
Cinzas	1,5 ± 0,7	6,9 ± 0,7	1,0 ± 0,5

*Média ± desvio padrão;

Os resultados apresentados obtidos para CMSA (b.u) são semelhantes aos encontrados por Yeannes e Casales (2008) que capturaram anchoita no mês de setembro (primavera) a qual apresentou a composição proximal do músculo de 78,6% de umidade, 17,9% de proteína, 2,9% de lipídeos e 1,1% de cinzas. Freitas (2011) elaborou isolado protéico a partir do músculo de anchoita com 76,8% de umidade, 17,6% de proteína, 2,8% de lipídeos e 1,1% de cinzas. A composição proximal do pescado depende da espécie, idade, estado fisiológico, época e região da captura. Dependendo desta, podem-se obter produtos com diferentes teores protéicos (ORDÓÑEZ, 2005). Segundo YEANNES e CASALES (1995) a composição proximal da anchoita possui grande variação em função das diferentes estações do ano, inverno e primavera, resultando em produtos com diferente teor protéico. Devido a este fato, a captura da anchoita citada por de Freitas (2011) pode ter ocorrido em diferentes estações do ano, resultando nas diferenças anteriormente citadas.

O isolado protéico de anchoita, seco a 40°C, apresentou 88,8% de proteína, 1,3% de lipídeos e 1,0% de cinzas. Este conteúdo de proteína foi superior ao obtido por García e Sobral (2005), na qual elaboraram filmes com 86,0% de proteínas

isoladas de Tilapia da Tailândia liofilizada. Também foi superior a 80,0% de proteína isolada de Tilapia do Nilo, extraída por Paschoalick et al. (2003) para a elaboração de filmes à base de isolado protéico. Neste trabalho o método utilizado para extração, temperatura, secagem, força centrífuga utilizada para separação e uma relativa concentração de proteínas sarcoplasmáticas solúveis em água, entre outros, podem ter contribuído para os diferentes teores de isolados protéicos (NOLSOE e UNDELAND, 2009; TASKAYA et al., 2009).

3.1.3 Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos presentes no isolado protéico de anchoita se apresenta na Tabela 3. Os aminoácidos presentes em maior concentração no IPA foram o ácido glutâmico, lisina, leucina e ácido aspártico.

Tabela 3 - Composição de aminoácidos (mg aminoácidos.100 g⁻¹ IPA) do isolado protéico de anchoita

Aminoácido	(g aminoácido.100 g⁻¹ de IPA)
Alanina (Hidrofóbico)	5,55 ± 0,42
Arginina (Hidrófilo)	4,14 ± 0,20
Ácido aspártico (Hidrófilo)	9,20 ± 1,70
Cisteína (Hidrófilo)	0,32 ± 1,12
Ácido glutâmico (Hidrófilo)	14,42 ± 0,60
Glicina (Hidrofóbico)	4,30 ± 0,08
Histidina (Hidrófilo)	3,02 ± 0,06
Isoleucina (Hidrofóbico)	6,43 ± 0,95
Leucina (Hidrofóbico)	10,18 ± 0,37
Lisina (Hidrófilo)	11,36 ± 0,77
Metionina (Hidrofóbico)	3,95 ± 0,04
Fenilalanina (Hidrofóbico)	5,11 ± 0,53
Prolina (Hidrofóbico)	4,15 ± 2,99
Serina (Hidrofóbico)	2,99 ± 5,01
Treonina (Hidrofóbico)	4,76 ± 2,82
Tirosina (Hidrofóbico)	4,11 ± 0,89
Valina (Hidrofóbico)	6,00 ± 0,50

Os aminoácidos polares corresponderam a 53,3% do total de aminoácidos do isolado protéico de anchoita. Os aminoácidos polares que estão em maior concentração são o ácido aspártico, ácido glutâmico e lisina, tais como no isolado protéico do músculo de Tilápia do Nilo obtido por Paschoalick et al. (2003). O grande número de aminoácidos hidrófilos aumenta a proporção de resíduos de aminoácidos de cadeias laterais polares, as quais interagem com a molécula de água (SOUZA, 2001).

O baixo conteúdo de cisteína implica em uma baixa densidade de ligações covalentes, dissulfeto (-S-S-), que sucedem em nível intra e intermolecular de alta energia de interação. Entretanto, esta baixa densidade de energia de ligação dissulfídrica torna a proteína mais solúvel (OKAMOTO, 1978). Devido a isto, os filmes elaborados à base de IPA possuem característica hidrófila, o que resulta em filmes com maior solubilidade e permeabilidade ao vapor de água.

3.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Figura 7 apresenta o termograma do IPA. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é utilizada para caracterizar as propriedades térmicas das proteínas, incluindo a desnaturação (YONGSAWATDIGUL e PARK, 2003).

O pico de desnaturação endotérmico do IPA foi observado na temperatura de 62,2°C, temperatura de desnaturação superior a encontrada para a miosina, 35,0°C por Yongsawatdigul e Park (2003). O pico endotérmico do termograma do DSC das proteínas está relacionado à ruptura de ligações de hidrogênio (YIN et al., 2011).

A entalpia de desnaturação foi de 6,4 J.g⁻¹ para o IPA, extraído a partir de uma solubilização alcalina em pH 11,2, sendo este valor inferior ao encontrado por Lee et al. (2007) em isolado protéico de lentilha, onde eles verificaram que o mesmo apresentou uma ΔH de 9,2 J.g⁻¹, para o isolado obtido através de uma extração alcalina (pH 9,5) à 22°C. Segundo estes, a entalpia diminui com o acréscimo do pH da solução, porque a estrutura da proteína desenrola com o distanciamento do pH do ponto isoelétrico durante o processo de solubilização (pH alcalino).

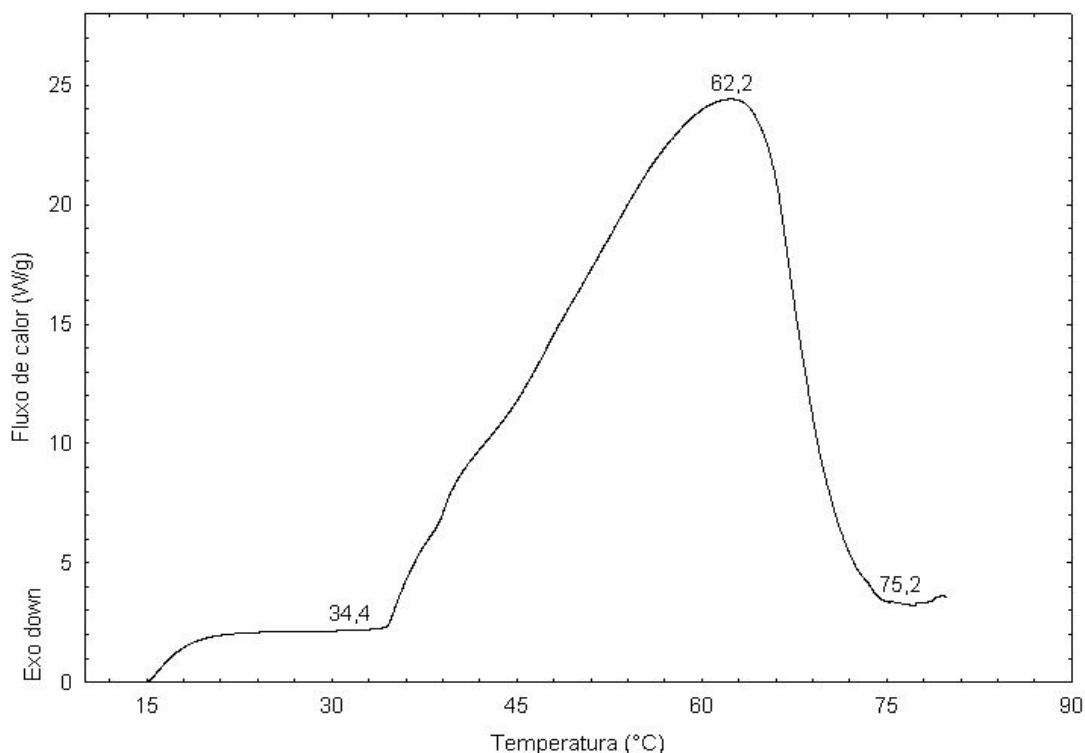


Figura 7 - Termograma apresentado pelo isolado protéico de anchoita.

O processo de desnaturação é uma mudança intramolecular, envolvendo a mudanças de ordem interna, e, em alguns casos, o completo desdobramento de cadeias peptídicas (GUERRERO e CABA, 2010). O ΔH representa a proporção de proteína não desnaturada em uma amostra e está correlacionada com a extensão da estrutura ordenada da proteína (YIN et al., 2011). Segundo Wang et al. (1999) quando ΔH apresenta valores próximos à zero, indica que as proteínas estão completamente desnaturadas. Neste trabalho, o IPA se apresentou mais desnaturado quando comparado ao de Lee et al. (2007).

3.4 Caracterização dos filmes à base de isolado protéico de anchoita

A Tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas dos filmes elaborados à base de isolado protéico de anchoita, segundo planejamento fatorial 2^3 . Os filmes apresentaram-se manuseáveis e de fácil remoção das placas de Petri em todos os diferentes experimentos realizados.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas apresentadas por filmes elaborados à base de isolados protéicos de anchoita

Experimento	IPA	G	T(°C)	ΔE^*	Y(%)	RT (MPa)	E (%)	ES (mm)	S(%)	PVA
1	3,0 (-1)	30(-1)	74(-1)	64,7 \pm 0,3	15,7 \pm 0,3	3,9 \pm 0,0	9,1 \pm 1,1	0,172 \pm 0,010	27,3 \pm 0,8	8,2 \pm 0,3
2	4,0 (+1)	30(-1)	74(-1)	66,2 \pm 0,0	15,1 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	15,3 \pm 0,2	0,176 \pm 0,030	29,8 \pm 0,4	8,3 \pm 0,1
3	3,0 (-1)	40(+1)	74(-1)	60,6 \pm 0,3	15,5 \pm 0,3	1,8 \pm 0,1	17,0 \pm 1,3	0,136 \pm 0,020	35,3 \pm 0,9	10,5 \pm 0,8
4	4,0 (+1)	40(+1)	74(-1)	67,6 \pm 0,2	15,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	29,5 \pm 0,8	0,166 \pm 0,000	41,3 \pm 1,0	12,2 \pm 0,7
5	3,0 (-1)	30(-1)	90(+1)	69,5 \pm 0,3	17,3 \pm 0,8	1,6 \pm 0,4	14,5 \pm 0,1	0,142 \pm 0,030	37,5 \pm 0,2	8,5 \pm 0,2
6	4,0 (+1)	30(-1)	90(+1)	70,4 \pm 0,2	18,1 \pm 0,6	1,4 \pm 0,0	20,0 \pm 0,5	0,139 \pm 0,010	40,4 \pm 0,5	8,6 \pm 0,1
7	3,0 (-1)	40(+1)	90(+1)	62,4 \pm 0,1	17,5 \pm 0,4	0,6 \pm 0,5	27,8 \pm 1,1	0,113 \pm 0,010	45,2 \pm 0,2	11,6 \pm 0,6
8	4,0 (+1)	40(+1)	90(+1)	71,4 \pm 0,2	16,6 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	35,2 \pm 1,2	0,140 \pm 0,010	50,1 \pm 0,8	11,8 \pm 0,7
9	3,5 (0)	35 (0)	82(0)	53,6 \pm 0,4	13,0 \pm 0,4	1,5 \pm 0,7	23,8 \pm 0,8	0,130 \pm 0,000	34,0 \pm 0,9	9,4 \pm 0,9
10	3,5 (0)	35 (0)	82(0)	53,2 \pm 0,1	13,3 \pm 0,0	1,5 \pm 0,1	24,0 \pm 0,5	0,149 \pm 0,010	35,7 \pm 0,1	9,6 \pm 0,3
11	3,5 (0)	35 (0)	82(0)	53,2 \pm 0,2	13,5 \pm 0,6	1,5 \pm 0,2	24,7 \pm 0,3	0,138 \pm 0,010	33,4 \pm 1,2	10,5 \pm 0,2

IPA: isolado protéico de anchoita (g.100 g⁻¹ SF); G: glicerol (g glicerol.100 g⁻¹ IPA); ΔE^* : diferença de cor; Y: opacidade (%); RT: resistência à tração (MPa); E: alongação (%); ES: espessura (mm); S: solubilidade (%); PVA: permeabilidade ao vapor de água g.mm.(kPa d m2)⁻¹; Média \pm desvio padrão.

3.4.1 Espessura

Os filmes elaborados com isolado protéico de anchoita foram facilmente manuseáveis e homogêneos. A espessura dos filmes à base de IPA é apresentada na Tabela 4. A espessura apresentou um modelo estatisticamente significativo, devido a coeficiente de correlação R^2 0,89 ($p \leq 0,05$). Entretanto, na análise de variância o mesmo apresentou um $F_{\text{calculado}}$ de 0,16 sendo menor que o F_{tabelado} de 4,53. Portanto, o modelo não é preditivo e as superfícies de contorno não poderão ser apresentadas. A maior espessura observada foi de 0,176 mm em filmes elaborados com 4,0 g de IPA , 30 g de glicerol.100g⁻¹ IPA e tratamento térmico de 74°C, comparado com os filmes contendo 3,0 g de IPA , 30 g.100g⁻¹ IPA e 74°C. A espessura aumentou linearmente com o aumento no conteúdo de sólidos totais secos (IPA) na matriz polimérica após a secagem, para o mesmo conteúdo de glicerol e temperatura (GARCÍA e SOBRAL, 2005).

Filmes preparados com a mesma concentração de isolado protéico de anchoita, mas com proporção diferente de plastificante, mostraram diferentes valores de espessura, possivelmente pelo efeito de diluição deste (GOUNGA et al, 2007). Os filmes elaborados com IPA apresentaram maior espessura do que os elaborados com proteínas de outros pescados, como o isolado protéico de tilápia vermelha (TONGNUANCHAN et al, 2011). Segundo Tongnuanchan et al. (2011) o filme foi elaborado com 2,0% (p/v) de isolado protéico e 50% (g glicerol.100 g⁻¹ isolado protéico) apresentou 0,034 mm. Os resultados obtidos sugerem que os filmes elaborados com IPA apresentaram maior espessura devido ao maior conteúdo de sólidos solúveis secos, e o menor conteúdo de glicerol adicionado resultando em menor diluição e maior espessura.

3.4.2 Solubilidade dos filmes

Os filmes de IPA permaneceram íntegros, após a imersão em água durante 24 horas sob agitação constante indicando que a rede de proteínas permaneceu intacta, em vista que a solubilidade em água é um fator importante para a determinação de possíveis aplicações de filmes compostos de agropolímeros concordando com Embuscado e Ruber (2009). O coeficiente de determinação para a solubilidade foi de R^2 0,90 com 95% de confiança, portanto o modelo foi significativo e preditivo, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi 5,7 vezes maior que o F_{tabelado} . Os efeitos estimados, coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) para a resposta solubilidade do processo de elaboração dos filmes a base de isolado protéico de anchoita (IPA) são

apresentados nos Apêndices 1, 2 e 3 respectivamente. As curvas de contorno puderam ser apresentadas e o modelo que descreve a curva de contorno para a solubilidade é apresentado na Tabela 5. A solubilidade dos filmes aumentou de 27,3% para 50,1%, conforme mostrado na Tabela 4. Tongnuanchan et al. (2011) observaram que o filme baseado em isolado protéico de músculo de tilápia obtiveram solubilidades que variaram de 21,4% a 56,0%, valores semelhantes ao presente estudo. Hoque et al. (2011) verificaram maior solubilidade 81,5%, em isolados protéicos de feijão. A solubilidade dos filmes foi influenciada positivamente pelo conteúdo de isolado protéico de anchoita, glicerol e temperatura de tratamento térmico que pode ser observado na Tabela 5. Entretanto, não houve uma interação significativa entre as diferentes variáveis (IPA, glicerol e temperatura de tratamento térmico).

Tabela 5 - Modelos da curva de contorno de regressão para os parâmetros de e solubilidade (S), resistência à tração (RT) e alongação (E)

Parâmetros	Equação	R ²
S	$Y = 37,30 + 2,04 X_1 + 4,61 X_2 + 4,94 X_3$	0,90
RT	$Y = 1,68 - 0,22 X_1 - 0,30 X_2 - 0,70 X_3 + 0,19 X_1 X_3 + 0,25 X_2 X_3$	0,98
E	$Y = 21,90 + 3,96 X_1 + 6,30 X_2 + 3,33 X_3 + 1,02 X_1 X_2 - 0,73 X_1 X_3 + 0,79 X_2 X_3$	0,96

Y: resposta; X₁: IPA (g.100g⁻¹ SF); X₂: glicerol (g.100g⁻¹ IPA); X₃: tratamento térmico; R²: coeficiente de determinação (p<0,05).

O aumento na temperatura de tratamento térmico e do conteúdo de IPA favoreceu o aumento na solubilidade dos filmes, conforme apresenta a Figura 8a, pois pode causar a exposição de monômeros e peptídeos de pequena massa molecular, além de material não-protéico, ocasionando um aumento na solubilidade desses filmes (STUCHELL e KROCHTA, 1994; PÉREZ-GAGO et al., 1999). Os resultados mostraram grande influência da concentração do IPA nesta propriedade. Os filmes de proteínas de pescado têm grande afinidade pela água, devido ao caráter hidrófilo dos aminoácidos constituintes no isolado protéico de pescado (Paschoalick et al., 2003). Neste estudo, os aminoácidos polares correspondem cerca de 53,3% do total de aminoácidos do IPA, conforme apresentado na Tabela 3, resultando em maior solubilidade do filme em água.

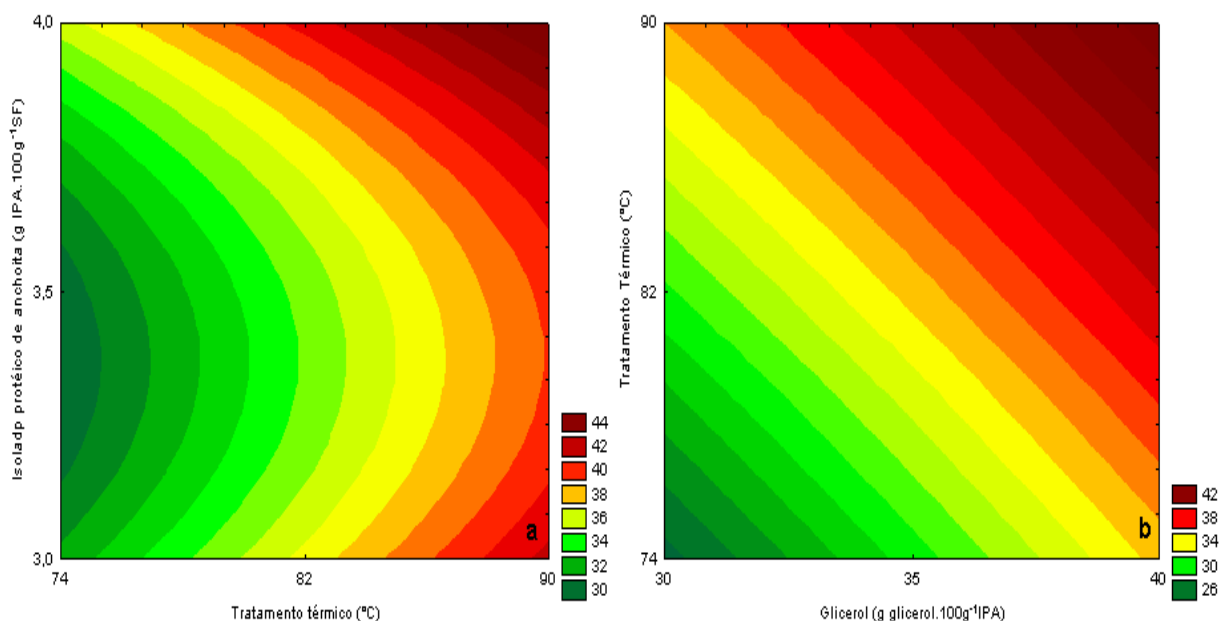


Figura 8 – Curva de contorno da resposta solubilidade: (a) conteúdo de isolado protéico de anchoita versus tratamento térmico (b) tratamento térmico versus concentração de glicerol.

A solubilidade em água dos filmes aumentou com a concentração de glicerol e do tratamento térmico como apresenta a Figura 8b. Os resultados mostraram grande influência do plastificante sobre esta propriedade. O aumento do teor de glicerol resultou em um aumento na solubilidade em água dos filmes, devido ao caráter hidrófilo do glicerol (VIEIRA et al., 2011).

3.4.3 Permeabilidade ao vapor de água - PVA

Os valores de permeabilidade ao vapor de água dos filmes à base de IPA são demonstrados na Tabela 4. No presente estudo, segundo a análise de variância, o modelo não foi significativo para permeabilidade ao vapor de água, devido ao baixo coeficiente de determinação R^2 de 0,06.

O PVA dos filmes variaram de 8,2 a 12,2 g.mm (kPa d m²)⁻¹ esses são menos permeáveis que os filmes à base de isolado protéico de ervilha, que variaram de 10 a 30 g.mm (kPa d m²)⁻¹ (KOWALCZYK e BARANIAK, 2011). Segundo Garcia et al. (1989) um material pode ser considerado de alta barreira ao vapor de água, quando apresenta uma taxa de permeabilidade menor ou igual que 8 g.mm (kPa d m²)⁻¹. Os filmes elaborados com o menor conteúdo de IPA, glicerol e tratamento térmico apresentaram uma permeabilidade ao vapor de água de 8,2 g mm (kPa d m²)⁻¹, sendo este considerado um filme com alta barreira a PVA.

3.4.4 Propriedades mecânicas

Os filmes devem ter uma resistência mecânica suficiente para garantir a integridade dos mesmos quando utilizado como embalagem. As propriedades mecânicas de resistência à tração e alongação dos filmes elaborados com IPA são apresentadas na Tabela 4. O coeficiente de determinação para a resistência à tração (RT) e alongação (E) foram 0,98 e 0,96 com o de $F_{\text{calculado}}$ 18,42 e de $F_{\text{calculado}}$ 2,53 vezes maior que o F_{tabelado} respectivamente, com nível de confiança de 95%. O modelo linear matemático que descreve a curva de contorno para a RT e E é demonstrado na Tabela 4. Os efeitos estimados, coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) para a resposta resistência a tração - RT (MPa) e E do processo de elaboração dos filmes a base de isolado protéico de anchoita (IPA) são apresentados nos Apêndices 4, 5, 6, 7, 8 e 9 respectivamente.

A (RT) e E dos filmes variaram de 0,6 a 3,9 MPa, e de 9,1 a 35,2%, respectivamente. Os filmes com IPA apresentaram maior RT, que o filme elaborado com isolado protéico de feijão, o qual apresentou um de resistência à tração de 1,1 MPa (HOQUE et al., 2011). Denavi et al. (2009) observaram que filmes à base de isolado protéico de soja obtiveram uma alongação de 13,0%. Portanto, como apresenta a Tabela 4, a E do filme de IPA foi maior que os filmes à base de isolado protéico de soja.

A RT dos filmes foi influenciada negativamente pelo conteúdo de IPA, glicerol e temperatura do tratamento térmico o que pode ser observado na Tabela 5. Os experimentos 1 e 2 com 3,0 e 4,0 g.100 g⁻¹ de SF e 30 g.100⁻¹ de IPA a 74 °C, valores de RT de 3,9 e 2,9 MPa, respectivamente, elevados em comparação aos demais experimentos. A influência do teor de glicerol e temperatura sobre a RT do filme à base de IPA é apresentada na Figura 9a.

Assim, verificou-se que a RT diminuiu significativamente com o aumento de glicerol. O glicerol reduz a densidade das interações proteína-proteína, aumentando a mobilidade de cadeias poliméricas e, conseqüentemente, tornando os filmes menos resistentes. Contudo, a adição de um agente plastificante é necessária, a fim de superar a característica quebradiça dos filmes sem adição de plastificante e, conseqüentemente, melhorar a flexibilidade deste concordando com Cao et al. (2007). Foi semelhante à Guerrero et al. (2010) que observaram que, com o aumento da adição de glicerol em filmes de isolado protéico de soja, ocorreu um decréscimo na RT.

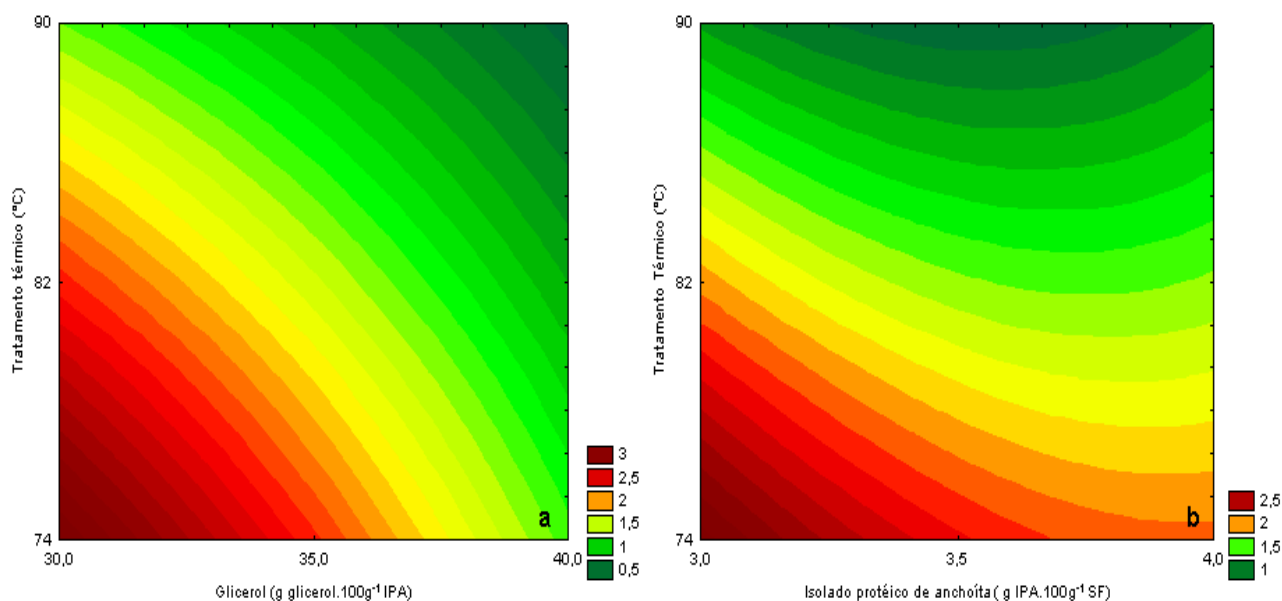


Figura 9 – Curva de contorno da resposta resistência à tração: (a) tratamento térmico versus conteúdo glicerol; (b) tratamento térmico versus conteúdo de isolado protéico de anchoita.

Neste estudo, foi observado que com o aumento da temperatura do tratamento térmico, entre 74 a 90 °C ocorreu um decréscimo na resistência à tração, conforme demonstrado na Figura 9b. A RT aumentou de 1,6 a 3,9 MPa, com a redução da temperatura do tratamento térmico de 90 para 74°C para o mesmo conteúdo de IPA e glicerol. Pérez-Gago e Krochta (2001) estudaram o efeito do tratamento térmico sobre as propriedades mecânicas de filmes à base de isolados protéicos de soro de leite, onde observaram que o aumento da temperatura do tratamento térmico de 80 para 90 °C, resultou em uma redução na RT dos filmes de 14 a 9 MPa, respectivamente. Estes dados comprovam que com o aumento do tratamento térmico há uma redução na RT dos filmes, o que faz com que os mesmos ofereçam menor resistência mecânica, resultando em filmes frágeis que poderão ter aplicações em alimentos que não exijam elevada RT.

No trabalho de Hoque et al. (2011), eles concluíram que o aumento da temperatura de 70 para 90 °C contribuiu para a redução de RT de 8,9 a 5,0 MPa, em filmes de gelatina de pele de pescada. Esse comportamento foi observado para temperaturas maiores que 70°C, pois causam a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, as ligações – SH de grupos hidrofóbicos, podem ficar indisponíveis para a formação de ligação de dissulfeto concordando com García e Sobral (2005). O termograma do IPA, apresentado na Figura 7, indica que em 75,2 °C

ocorre o fim da desnaturação, temperaturas maiores que esta pode prejudicar as ligações – SH de grupos hidrofóbicos, fazendo com que fiquem indisponíveis para a formação de ligação de dissulfeto. Não obstante, o impacto do aquecimento sobre as propriedades dos filmes pode variar com as fontes de proteína (HOQUE et al., 2010).

A Figura 9b apresentou a influência da concentração de IPA sobre a resistência à tração dos filmes. A resistência à tração diminuiu significativamente com o aumento de concentração de IPA. Iwata et al. (2000) tinham observado que a redução da concentração de proteínas sarcoplasmáticas de 4% para 2% na solução filmogênica ocasionou um aumento na resistência à tração dos filmes. Todavia, Pérez-Gago e Krochta (2001), Choi e Han (2002) observaram, que com o aumento na concentração de proteína ocorre um acréscimo na RT.

A interação entre a concentração de glicerol e IPA mostrou um efeito positivo sobre a elongação do filme. O aumento na concentração de IPA e plastificante na solução filmogênica (SF), contribui para o aumento na elongação dos filmes, conforme verificado na Figura 10a.

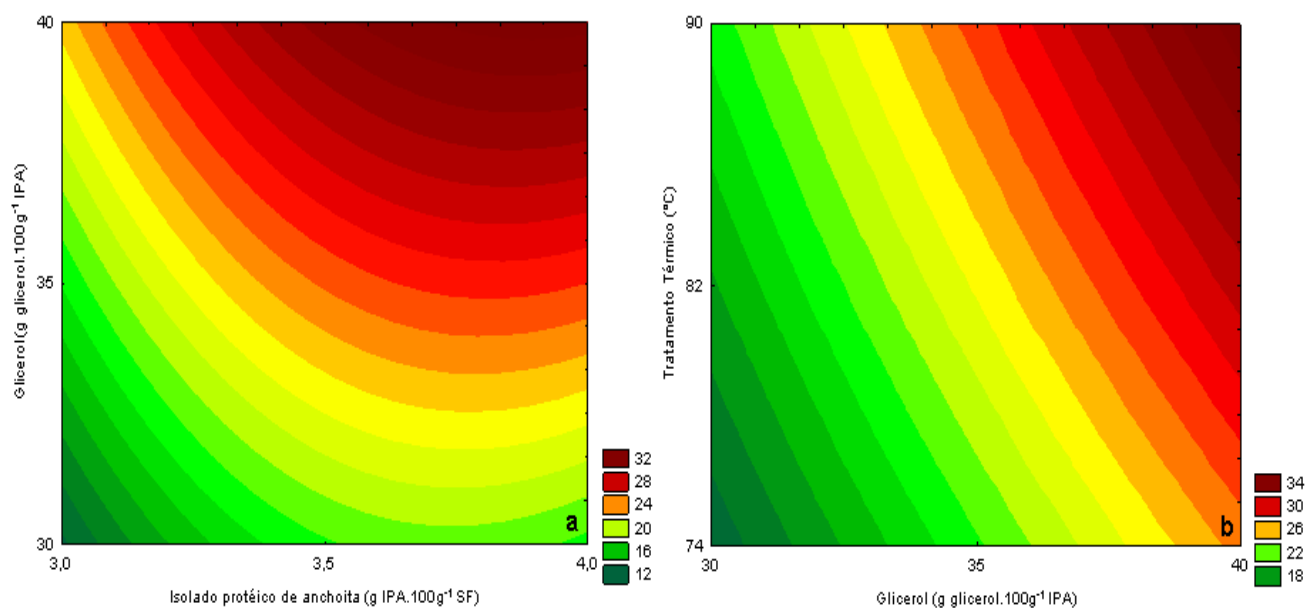


Figura 10 – Curva de contorno da resposta elongação: (a) conteúdo de glicerol versus conteúdo de isolado protéico de anchoita; (b) tratamento térmico versus conteúdo de glicerol.

Isto pode ser observado quando houve um aumento de 3,0 a 4,0 g.IPA 100g⁻¹ SF e na concentração de plastificante de 30,0 a 40,0 g de glicerol 100.g⁻¹ IPA. Isto já

tinha sido observado por Cao et al. (2007), que aumentaram a concentração de glicerol de 10 para 40% na formulação dos filmes, aumentando a alongação. Desta forma, a adição de glicerol na SF aumentou de extensibilidade do filme, muito embora se reduzisse a resistência à tração. Em filmes sem plastificante, os filmes eram quebradiços e difíceis de manusear.

A alongação dos filmes foi afetada positivamente por todos os parâmetros do processo e a interação entre eles, exceto pela interação entre concentração de IPA e tratamento térmico, o que pôde ser observado pelo modelo matemático (Tabela 5). Pérez-Gago e Krochta (2001) observaram que a alongação de filmes à base de isolado protéico de soro de leite aumentou com o acréscimo na temperatura de solução filmogênica. O mesmo comportamento foi observado no presente estudo, houve um aumento na alongação de 9,1% para 35,2% em temperaturas de 74 a 90 °C, conforme mostra a Figura 10b. De acordo com Hoque et al. (2010), o aumento na E do filme, com temperatura maior que 70°C, em temperaturas elevadas resultou na formação de um filme com uma rede de menor rigidez.

3.4.5 Cor e Opacidade

Os valores de diferença de cor (ΔE^*) e a opacidade (Y) dos filmes à base de IPA, apresentados pelos filmes submetidos ao planejamento podem ser observadas na Tabela 4. A cor é um parâmetro importante na caracterização dos filmes ela está relacionada as características da matéria-prima utilizada para elaborar o filme. A diferença de cor (ΔE^*) dos filmes variou de 53,2 a 71,4 e isso foi observado quando as concentrações de IPA e glicerol aumentaram de 3,5 para 4,0 g de IPA.100g⁻¹ SF e de 35 para 40 g de glicerol.100g⁻¹ IPA e também com o aumento do tratamento térmico de 82 para 90°C. Entretanto eles não apresentaram um bom coeficiente de correlação R^2 0,21 ($p < 0,05$).

Os filmes obtidos no presente estudo mostraram maiores ΔE^* do que os filmes obtidos por Sobral (2000), elaborados à base de proteínas musculares do Tilápia do Nilo tratada a 40 °C durante 30 minutos, onde a diferença de cor variou de 7 para 8 . Como a anchoita é um pescado que tem músculo escuro, resulta em um acréscimo de cor no filme, ou seja, tornando-o mais escuro quando comparado a filmes elaborados com isolado protéicos de Tilápia do Nilo, por exemplo.

A opacidade dos filmes à base de IPA variou de 18,1 para 13,0%, quando houve uma diminuição de 4,0 para 3,5 g IPA.100g⁻¹ SF, e com uma concentração de plastificante de 30 e 35 g de glicerol.100g⁻¹ IPA, respectivamente, e diminuição do

tratamento térmico de 90 para 82°C; entretanto, não houve um modelo estatisticamente significativo, devido ao baixo coeficiente de correlação R^2 0,02 ($p \leq 0,05$). Paschoalick et al. (2003), em seus estudos com filmes formulados com 1 g de isolado protéico de Tilápia do Nilo 100 g^{-1} SF, tratada a 40 e 65°C durante 30 minutos, observaram uma opacidade variando entre 2 e 7%, sendo estes filmes menos opacos que os elaborados no presente trabalho. Isto sugere que a de cor e concentração de IPA, além do tratamento térmico mais elevado utilizado neste trabalho, pode ter contribuído para elaboração de filmes mais opacos. A opacidade é desejada para produtos, que a luz seja fator de deterioração, pois em filme opaco não ocorre transmissão de luz (VICENTINI, 2003).

3.5 Microestrutura dos filmes

A Figura 11 apresenta as microestruturas dos filmes à base de IPA.

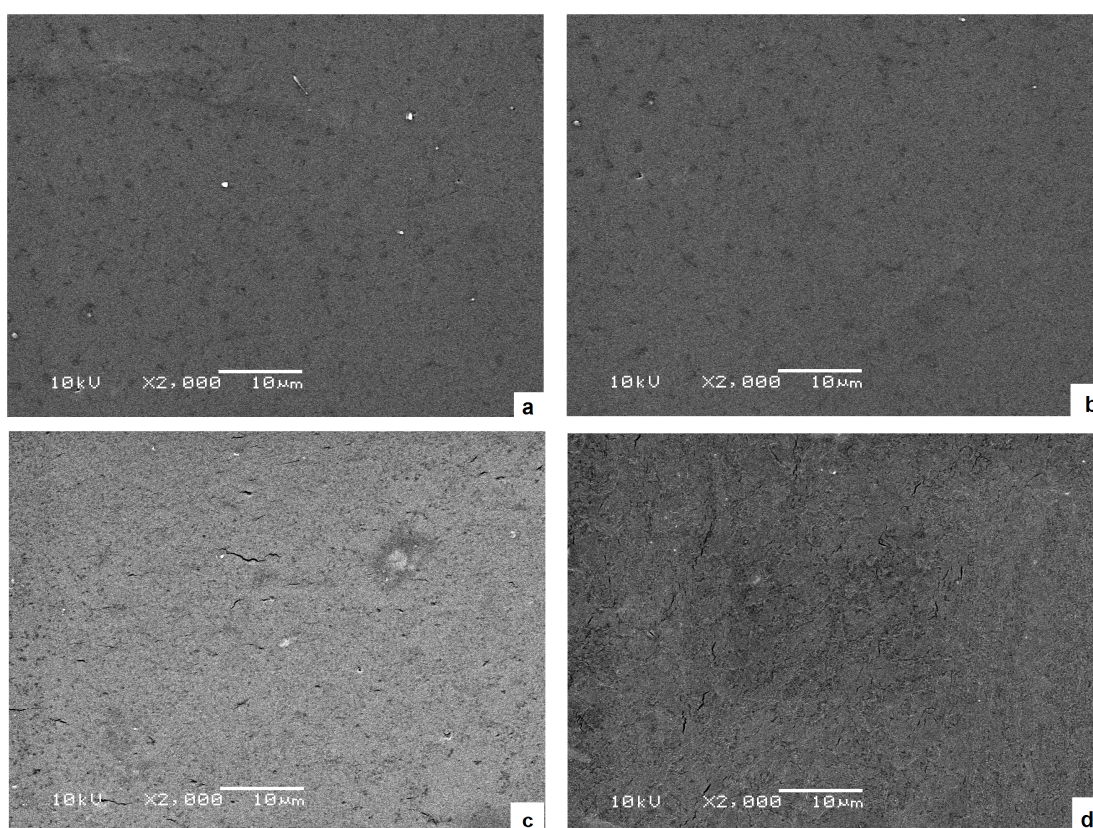


Figura 11 - Micrografias da superfície dos filmes à base de isolado protéico de anchoita em magnificação de 2000x - (a) 3,0 g IPA 100 g^{-1} SF com 30 g de glicerol 100 g^{-1} IPA e (b) 3,0 g IPA 100 g^{-1} SF com 40 g de glicerol 100 g^{-1} IPA e tratamento térmico de 74 °C; (c) 3,0 g IPA 100 g^{-1} SF com 30 de glicerol 100 g^{-1} IPA; (d) 3,0 g IPA 100 g^{-1} SF com 40 g de glicerol 100 g^{-1} IPA e tratamento térmico de 90 °C.

As microestruturas das superfícies dos filmes, com diferentes concentrações plastificantes e de tratamento térmico foram apresentados, pois mostraram maior efeito sobre a alongação, RT e na solubilidade, conforme descrito pela Tabela 4. Os experimentos selecionados para apresentar a morfologia da superfície foram 1 e 3 (3,0 g IPA.100g⁻¹ SF com 30 e 40 g de glicerol.100g⁻¹ IPA e tratamento térmico de 74 °C) são mostrados na Figura 11a e 11b, respectivamente; 5 e 7 (3,0 g IPA.100g⁻¹ SF com 30 e 40 de glicerol.100g⁻¹ IPA e tratamento térmico de 90 °C) são mostrados na Figura 11c e 11d.

A superfície dos filmes mostradas na Figura 11a e 11b apresentaram elevada homogeneidade, o que pode estar relacionado a melhor compatibilidade entre as variáveis, isto é, uma melhor interação entre as concentrações de glicerol, IPA e tratamento térmico. Isto resultou em melhores propriedades mecânicas dos filmes. No entanto, a Figura 9d mostrou maior rugosidade em comparação com a superfície dos demais experimentos. As rachaduras sobre a superfície do filme nas Figuras 11c e 11d, resultaram em uma diminuição da RT do filme. Este trabalho concordou com Monterrey-Quintero e Sobral (2000), pois uma superfície rugosa ou mais áspera sugere, que os filmes são frágeis.

4. CONCLUSÃO

O isolado protéico elaborado a partir de um pescado com baixo valor agregado, anchoita pode ser uma fonte alternativa como polímero para a elaboração de filmes homogêneos. A espessura, a permeabilidade ao vapor de água, a diferença de cor e a opacidade dos filmes não foram afetados pelas variáveis estudadas (concentração de isolado protéico de anchoita, glicerol e tratamento térmico) devido ao baixo coeficiente de determinação.

Os filmes foram menos solúveis em água, com o menor conteúdo de isolado protéico de anchoita e tratamento térmico. No entanto, os filmes foram mais solúveis em água, quando a concentração de glicerol variava de 30 à 40 glicerol.100g⁻¹ IPA. Os filmes elaborados com menor conteúdo de IPA, de concentração de glicerol e tratamento térmico foram mais resistentes. Não obstante, o aumento na concentração de glicerol resultou em um filme com maior alongação. O aumento do tratamento térmico da solução filmogênica resultou em um filme com uma superfície áspera e menos homogênea. Em geral, os isolados protéicos elaborados a partir de carne mecanicamente separada de anchoita, um pescado com baixo valor agregado, podem ser uma fonte alternativa de polímeros de interesse para elaboração de filmes com boas propriedades físico-químicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 17ª edição. Maryland: AOAC, 2000.

ASTM.; American Society for Testing and Materials. **Standard method for water vapor transmission of materials**, Designation E96-95. In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1995.

ASTM.; American Society for Testing and Materials. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**, Designation D882-91. In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1996.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal Chromatography**, v.336, p.93-104, 1984.

BOURTOOM T. Review article: Protein edible film: Properties enhancement. **International Food Research**, v. 16, p.1- 9, 2009.

BODINI, R,B.; **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1153–1162, 2007.

CASTELLO, L.; CASTELLO, J.P. Anchovy stocks (*Engraulis anchoita*) and larval growth in the SW Atlantic. **Fisheries Research**, v. 59, p. 409-421, 2003.

CHEN, Y.I.; JACZYUNSKI, J. Protein recovery from rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by products via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties an affected by functional additives. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 9079–9088, 2007.

CHEN, M.X.; YEH, G.H.C.; CHIANG, B.H.C. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, p.379-390, 1996.

CHO, S. Y.; RHEE, C.; Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. **Lebensmittel-Wissenschaft Technology**, v. 37, p.833–839, 2004.

CHOI, W.S.; HAN, J.H.; Film-forming mechanism and heat denaturation effects on the physical and chemical properties of pea protein-isolate edible films. **Journal of Food Science**, v.67, p.1399-1406, 2002.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, p.1369–1374, 1995.

DENAVI,G.A.; PÉREZ-MATEOSMM.; AÑÓN,M.C.; MONTERO, P.; MAURI,A.N.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.2094–2101, 2009.

EMBUSCADO, M.E.; HUBER, K.C. **Edible film and coatings for food applications**. New York , Springer, 2009. 403p.

FALGUERA, V.;QUINTERO, J.P.;JIMÉNES, A.; MUÑOZ, J.A.; IBARZ,A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use.**Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.292-303, 2011.

FERREIRA, C.O., NUNES, C.A., DELGADILLO, I. & SILVA, J.A.L. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v.42, p. 807–813, 2009.

FREITAS I. R. **Otimização do processo de obtenção de isolados protéicos provenientes de pescado de baixo valor comercial**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GARCIA, L. V. **Avaliação das propriedades funcionais da anchoita (*Engraulis anchoíta*) e das modificações produzidas durante o armazenamento em gelo e água do mar e processamento**. 2007. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande , Rio Grande.

GARCIA, F.T.; SOBRAL, P.J.A. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. **Food Science and Technology**, v.38, p.289-296, 2005.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal Food Science Technology**, v. 29, p. 39–50, 1994.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 93, p. 511-520, 2005.

GOUNGA, M.E.; XU, S.Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.521–530, 2007.

GUERRERO, P.; CABA,K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.261-269, 2010.

GUERRERO, P.; RETEGI, A.; GABILONDO, N.; CABA, K. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, v.100, p. 145–151, 2010.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Protein pf blend film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin and mungbean protein isolated. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p.663-673, 2011.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Journal of Food Engineering**, v.96, p. 66–73, 2010.

IWATA, K.; ISHIZAKI, S.; HANDA, A.; TANAKA, M. Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v.66, p.372-378, 2000.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. **Journal of Food Engineering**, v.105, p.295–305, 2011.

KROCHTA, J.M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: GENNADIOS, A. (Ed.). Protein-based films and coatings. Boca Raton: CRC Press, p.1-32, 2002.

LEE, H.C.; HTOON, A.K.; UTHAYAKUMARAM, S.; PATERSON, J.L. Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger. **Food Chemistry**, v.102, p.1199–1207, 2007.

LIMPAN, N.; PRODPRAN T.; BENJAKUL S. & PRASARPAN S. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p.85-92, 2010.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 179-189, 2000.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I.; The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food Bioprocess and Technology**, v. , p.1-27, 2009.

OKAMOTOM S.; Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**, v.23, n.5, p.257-262, 1978.

ORDÓÑEZ, J. A.; **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005, 279p.

OU, S.; WANG, Y.; TANG, S.; HUANG, C.; JACKSON, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v.70, p. 205-210, 2005.

PASCHOALICK, T.M.; GARCIA, F.T.; SOBRAL, P.J. do A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.419-427, 2003.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Denaturation time and temperature effect on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, v.66, p.705-710, 2001.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, p. 695-698, 1999.

SOBRAL, P.J. do A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1251-1259, 2000.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; HUBINGER, M.D.; ROQUES, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.423-432, 2001.

SOBRAL, P. J. A, MONTERREY-QUINTERO, E. S., HABITANTE, A. M. Q. B. Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.67, p.499–504, 2002.

SOUZA, S.M.A.; **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares bovina**. 2001. 207f. Tese

(Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 1332-1337, 1994.

SWAIN, S. N.; BISWAL, S. M.; NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable soy-based plastics: Opportunities and challenges. **Journal of Polymer Environment**, v. 12, p.35-42, 2004.

TANAKA, M., IWATA, K., SANGUANDEEKUL, R. Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v.67, 346-351, 2001.

TASKAYA, L.; CHEN, Y. C.; JACZYNSKI, J. Functional properties of proteins recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. **Food Science and Technology**, v.42, p.1082-1089, 2009.

THORARINSDOTTIR, K.A.; ARASON, S.; GEIRSDOTTIR, M.; BOGASON, S.G.; KRISTBR GSSO, K. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 77, p.377-385, 2002.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p.758-767, 2011.

VIEIRA, M.G.A.; SILVA, M.A.; SANTOS, L.O.; BEPPU, M.M.; Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v.47, p.254-263, 2011.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 62f. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 411-417, 1999.

YEANNES, M.I.; CASALES, M.R Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoita (*Engraulis anchoita*). **Revista Alimentaria**, v.262, p. 87–91, 1995.

YEANNES, M.I.; CASALES, M.R. Modifications in the chemical compounds and sensorial attributes of *Engraulis anchoita* fillet during marinating process. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.798-803, 2008.

YIN, S.; CHEN, J.; SUN, S.; TANG, C.; YANG, X.; QI, J. Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). **Food Chemistry**, v.128, p.420–426, 2011.

YONGSAWATDIGUL, J.; PARK, J.W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. **Food Chemistry**, v.83, p.409-416, 2003.

ARTIGO 2
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FILMES À BASE DE ISOLADO
PROTÉICO DE PESCADO INCORPORADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS E SUA
AÇÃO ANTIMICROBIANA CONTRA PATÓGENOS ALIMENTARES

Propriedades Físico-químicas dos Filmes à Base de Isolado Protéico de Pescado Incorporados com Ácidos Orgânicos e sua Ação Antimicrobiana contra Patógenos Alimentares

RESUMO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana de filmes de isolado protéico de anchoita (IPA) incorporados com 0,50 ou 0,75 ou 1,50% (p/v) de ácido sórbico (AS) ou ácido benzóico (AB), contra *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis pelo método de difusão em discos. O efeito do filme de IPA contendo 1,50% de AB ou AS foi testado em carne bovina inoculada com *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* durante o armazenamento a 5°C e também foi examinado o impacto dos agentes antimicrobianos sobre as propriedades físico-químicas dos filmes. A maior atividade antimicrobiana foi verificada com 1,50% de AS e AB frente a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. Os filmes com 1,50% de AS ou AB aplicados em carne bovina apresentaram a maior inibição da multiplicação da *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 em relação ao filme controle. O aumento da concentração de 0,50 a 1,50% de AS e AB resultou na diminuição da resistência à tração e aumento da elongação, permeabilidade ao vapor de água (PVA), solubilidade, diferença de cor e opacidade. Conforme determinado pela espectroscopia no infravermelho (FT-IV), houve mudança da organização molecular e interações intermoleculares entre as moléculas de isolado protéico e ácido sórbico e benzóico. As imagens de microscopia eletrônica de varredura na superfície do filme revelaram microporos em filmes contendo 1,50% de ácido sórbico, resultando em filmes com menor homogeneidade.

Palavras-chave: filmes, antimicrobianos, microrganismos.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of anchovy protein isolate (API) film incorporated with 0.50 or 0.75 or 1.50% (w/v) of sorbic acid (SA) benzoic acid or (BA) was assessed against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis by disc diffusion method. The effect of the API film containing 1.50% BA or SA was tested in meat inoculated with *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* during storage at 5°C and was also assessed the impact of antimicrobial agents on the physicochemical properties of the films. The greatest antimicrobial activity was observed with 1.50% of SA and BA against *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*. Films with 1.50% SA or BA applied in beef showed the greatest inhibition of multiplication of *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in relation to the control film. The increased concentration of 0.50 to 1.50% of SA and BA resulted in decreased tensile strength and increase elongation, water vapor permeability (WVP), solubility, difference in color and opacity. There was a change of the molecular organization and intermolecular interactions between the molecules of API and BA tested by FT-IR evaluation. The images of scanning electron microscopy revealed micropores on surface in films containing 1.50% sorbic acid, resulting in films with less homogeneity.

Keywords: Films, antimicrobials, microorganisms

1. INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos seguros impulsiona a busca por mecanismos de controle sobre a segurança dos mesmos. Surto de doenças transmitidas por alimentos (DTA) criaram a necessidade pela busca de métodos alternativos para o controle da multiplicação microbiana nos alimentos (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002). Entre estes métodos, encontram-se a incorporação de agentes antimicrobianos em filmes biodegradáveis, que podem ser utilizados como embalagens ativas (FALGUERA et al., 2011; GUILLARD et al., 2009; SIVAROUBAN et al., 2008; CAGRI et al., 2004).

O uso de filmes contendo agentes antimicrobianos apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais de adição direta de conservantes nos alimentos, visto que podem ser liberados de maneira controlada, estando, portanto, em menor quantidade no alimento e atuando, principalmente, na superfície do produto. Também pode ocorrer a inibição ou redução da atividade do antimicrobiano, quando adicionado de forma tradicional, por diversas substâncias do próprio alimento (KRISTO et al., 2008; QUINTAVALLA e VICINI, 2002).

Em geral, os filmes antimicrobianos devem ser eficazes contra um amplo espectro de microrganismos, eficientes em baixas concentrações dos compostos incorporados, não causar alterações nas características sensoriais do produto, ter um custo compatível, e cumprir com a legislação vigente (BRODY, 2001). Substâncias antimicrobianas utilizadas no desenvolvimento de filmes ativos devem ser aprovadas pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) para serem utilizadas, pois entram em contato com o alimento devido à migração destas para o alimento (SILVEIRA et al., 2007). Dentre os conservantes utilizados em alimentos, os ácidos orgânicos merecem destaque por possuírem baixa interferência no sabor e baixo nível de toxicidade (MORAES et al., 2007). Substâncias como ácido sórbico (LIMJAROEN et al., 2003), ácido benzóico (SOARES et al., 2002) e seu sais (BUONOCORE et al., 2003) são conservantes de alimentos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS).

As substâncias antimicrobianas ao serem incorporadas em material de embalagem, podem afetar as propriedades físicas (QUINTAVALLA e VICINI, 2002; HAN, 2000) e mecânicas (HAN, 2000) do filme obtido. Limjaroen et al. (2003) observaram um decréscimo na transparência do filme com adição de sorbato de potássio, porém não houve mudanças nas propriedades de tensão.

Cagri et al. (2001) verificaram que filmes a base de isolado protéico de soro de leite, incorporados com ácido sórbico, inibiram a multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. Pesquisas tem demonstrado eficiência dos conservantes frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, coliformes, bactérias psicotróficas, entre outras (JAY, 2005). Manab et al. (2011) incorporaram ácido benzóico em filmes elaborados a base de isolado protéico de soro de leite, o qual inibiu significativamente *E.coli* e *Salmonella* sp.. As bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* são agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, que despertam o interesse pelo desenvolvimento de filmes biodegradáveis incorporados com antimicrobianos que atuam sobre a multiplicação e lise destes, minimizando a ocorrência de surtos de origem alimentar.

Hoje o Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina e lidera o ranking dos países exportadores mundiais de carne bovina (ABIEC, 2011). Devido a suas características intrínsecas, a carne é um excelente substrato para multiplicação de inúmeros microrganismos, dentre eles encontram-se a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* (TONDO e BARTZ, 2011). A carne está exposta a contaminações de natureza microbiana em todas as fases do seu processamento, particularmente nas operações em que é mais manipulada e sempre que não são tomados cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Fabricação (SOFOS et al., 2008; PARDI et al., 2001). A carne e os produtos cárneos são um dos principais veículos de DTA, também são propensos a deterioração durante o armazenamento como todos os alimentos protéicos (CARDENAS et al., 2008). Uma das formas de controlar a multiplicação de microrganismos nestes produtos, aumentando a segurança dos alimentos, é a aplicação de antimicrobianos na superfície do produto (KERRY et al., 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana de filmes elaborados à base IPA incorporados com ácido sórbico e benzóico, em diferentes concentrações, frente aos microrganismos *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*. Foi aplicado o filme de maior inibição em carne bovina inoculada com os microrganismos que foram inibidos, para avaliar o efeito antimicrobiano em um alimento e também foi avaliado o efeito da adição dos antimicrobianos sobre as físico-químicas dos filmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

A carne mecanicamente separada foi processada na Unidade de Processamento de Pescado da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Esta foi obtida a partir de anchoita (*Engraulis anchoita*) capturada em cruzeiros realizados pelo Navio Oceanográfico Atlântico Sul da FURG, na zona costeira do sul do Brasil. Também foram utilizadas amostras de carne bovina refrigerada, obtidas em um supermercado local da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

2.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. Os meios e materiais foram esterilizados em autoclave vertical (Prismatec, CS-50, Brasil).

2.1.3 Cepas bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas foram cedidas da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande (UFRGS). Foram utilizadas cepas dos microrganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* O157:H7 isolada de surtos na Argentina proveniente do Instituto Nacional do Ministério da Saúde da Argentina (INEI - ANLIS). A *Salmonella* Enteritidis SE86 isolada de surtos de origem alimentar no Rio Grande do Sul foi cedida pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul - LACEN/RS, sendo esta a grande causadora de surtos de origem alimentar no RS. Os microrganismos Gram-positivos utilizados foram *Listeria monocytogenes*, isolada de carcaça bovina e *Staphylococcus aureus* cedido pelo banco de cepas de microrganismos do mesmo laboratório.

2.2 Obtenção do isolado protéico de anchoita

A Figura 5 mostra o fluxograma de obtenção do isolado protéico de anchoita (IPA), segundo metodologia descrita por Nolsoe e Undeland (2009) adaptada. O IPA foi obtido por solubilização alcalina (pH 11,2) e posterior precipitação isoelétrica (pH 5,0). O isolado protéico foi desidratado em estufa com circulação de ar (QUIMIS, Q342, São Paulo, Brasil) durante 16 horas a 40°C. O isolado protéico de anchoita foi homogeneizado em moinho de facas (Tecnal, TE-645, Brasil) e a granulometria deste foi padronizada para 0,35 mm empregando peneiras de 42 mesh (Bertel, Caieiras, São

Paulo). Assim foi utilizado como base na elaboração dos filmes. O isolado protéico de anchoita foi caracterizado quanto à sua composição proximal segundo AOAC (2000).

2.3 Elaboração dos filmes antimicrobianos

A Figura 12 apresenta o fluxograma do processo de obtenção dos filmes antimicrobianos. A elaboração dos filmes provenientes de isolado protéico de anchoita (IPA) foi realizada segundo metodologia descrita por Limpan et al. (2010) e Cagri et al., (2003) adaptada. Os filmes foram elaborados segundo as melhores condições estudadas no artigo citado anteriormente que foram $3,0 \text{ g.IPA.100g}^{-1}\text{SF}$, $30\text{g glicerol.100g}^{-1} \text{IPA}$ e 74°C .

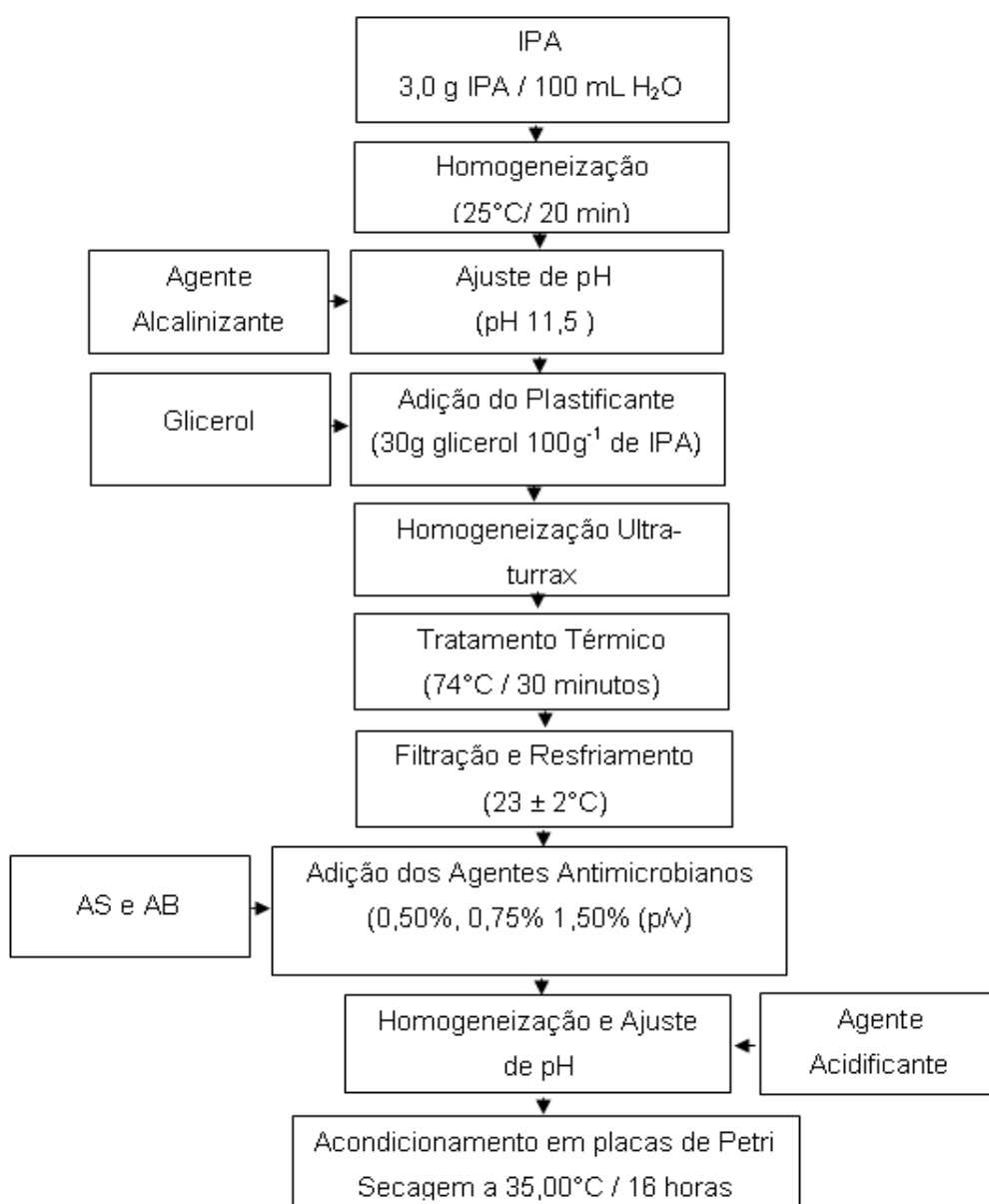


Figura 12 - Fluxograma da elaboração dos filmes antimicrobianos

Os filmes de IPA foram preparados pela técnica de *casting*, sob condições alcalinas. As soluções filmogênicas (SF) foram obtidas pela dispersão de 3,0 g IPA em 100 mL de água destilada, em reator de vidro acoplado com banho ultratermostático (QUIMIS, modelo 214D2) e foram homogeneizados sob agitação constante a 25°C, durante 25 minutos.

Posteriormente, o pH da solução filmogênica foi ajustado para 11,5 com solução de NaOH (1 mol L⁻¹), para solubilização das proteínas. Então, foi adicionado 30 g glicerol 100g⁻¹ de IPA à solução filmogênica e homogeneizado a 10.000 rpm durante 20 minutos em homogeneizador Ultra-turrax (IKA, T25 digital, Werke, Alemanha). Esta solução foi aquecida à temperatura de 74°C, em reator de vidro acoplado com banho ultratermostático sob agitação constante durante 30 minutos. A SF foi filtrada (para remoção de resíduos não dissolvidos) e resfriada em banho de água a 23 ± 2°C. Como controle foram utilizados os filmes sem adição dos agentes antimicrobianos, solubilizados em pH 1,5 e em pH 5,2. Sendo este o pH utilizado para a elaboração dos filmes antimicrobianos.

Os agentes antimicrobianos utilizados foram ácido sórbico ou benzóico em diferentes concentrações 0,50%, 0,75% ou 1,50% (p/v), e estes foram adicionados nas soluções filmogênicas após o resfriamento. Em seguida, foram homogeneizados sob agitação constante durante 20 minutos e o pH ajustado para 5,2 com solução de HCl (1 mol L⁻¹). As SF foram espalhadas em placas de Petri de acrílico estéreis (9 cm) e desidratadas em estufa com circulação de ar (FANEM, modelo 520, São Paulo, Brasil) a 35°C durante 16 horas. Então, os filmes foram acondicionados a 25°C durante 48 horas, sendo então submetidos aos diferentes testes.

2.3.1 Caracterização dos filmes antimicrobianos

2.3.1.2 Análise microbiológica dos filmes antimicrobianos

Foram realizadas análises microbiológicas em triplicata nos filmes de IPA com e sem incorporação de agentes antimicrobianos para contagem total de microrganismos aeróbios psicrotróficos, mesófilos e bolores e leveduras, segundo metodologia descrita pela APHA (2001). Foram homogeneizados 5 g de amostra em 45 mL de água peptonada 0,1% (p/v) e homogeneizados por agitação a temperatura ambiente durante 1 minuto. Então, foi retirada a alíquota de 1 mL desta, e foram realizadas sucessivas diluições, até 10⁴. Para contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos foi retirada uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição e inoculada na superfície da placa de Petri estéril, contendo o ágar Padrão de Contagem (PCA)

solidificado. O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski por toda a superfície do ágar. As placas foram incubadas invertidas, a 7°C, durante 7 dias. Para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada diluição e inoculada na superfície da placa de Petri estéril. Então, foram adicionados 15 a 20 mL de PCA a 45°C (fundido) e homogeneizados. As placas foram incubadas invertidas a 35°C, durante 48 horas. Para contagem de bolores e leveduras foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada na superfície da placa de Petri estéril, com o ágar Batata Dextrose solidificado acidificado com uma solução de ácido tartárico 10%. O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski por toda a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 25°C, durante 3 a 5 dias.

2.3.1.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com micrômetro digital (Insize, resolução 0,0001 mm). A espessura final foi calculada pela média aritmética de dez medidas aleatórias sobre a superfície do filme (GONTARD et al., 1994).

2.3.1.3 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo metodologia proposta e adaptada Gontard et al., (1994). Três discos de cada amostra de filme, com 2 cm de diâmetro, foram previamente pesados e imersos em 50 mL de água destilada. O sistema foi mantido sob agitação a 100 rpm em incubadora shaker refrigerada (Cientec, CT-712RNT, São Paulo, Brasil) a 25°C durante 24 horas. A quantidade de matéria seca inicial e final foi determinada em estufa a 105°C até peso constante. A solubilidade do filme representou o total de matéria solúvel dissolvida em água, incluindo proteínas solúveis, água e glicerol. A solubilidade em água foi calculada pela Equação 1:

$$S (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: S é a solubilidade em água (%); m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa final da amostra (g).

2.3.1.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico da ASTM E96-95 (1995) a 25°C. O filme foi selado em uma célula com $1,58 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ de área de permeação, contendo cloreto de cálcio anidro (0% UR). A

célula foi acondicionada em um dessecador, com solução saturada de cloreto de sódio (75% UR). A massa da célula foi verificada em intervalos de 24 horas, durante 48 horas. A permeabilidade ao vapor de água foi calculada através da Equação 2.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \frac{L}{A \Delta P} \quad (2)$$

Onde: PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g.mm) ($m^2 \cdot d \cdot kPa$); L é a espessura inicial do filme (mm); ΔW é o ganho de massa pela célula (g); t é o tempo de incubação (dia); A é a área exposta do filme (m^2) e ΔP é a diferença de pressão parcial (kPa).

2.3.1.5 Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e a alongação dos filmes foram determinadas, em triplicata, segundo metodologia da ASTM D-882-91 (1996), utilizando um texturômetro TA.XT_{plus} (Stable Micro Systems). As amostras foram cortadas em forma de retângulos (80 x 25 mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50 mm e velocidade de tração de $0,8 \text{ mm s}^{-1}$. A resistência a tração foi calculada através da Equação 3 e a alongação com a Equação 4.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad (3) \quad E = \frac{d_r - d_0}{d_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: RT é a resistência a tração (MPa); F_m é a força máxima no momento da ruptura (N); A é a área da seção transversal do filme (m^2); E é a alongação (%); d_0 é a separação inicial entre as garras (cm) e d_r é a separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

2.3.1.6 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi expressa como diferença de cor (ΔE^*) utilizando colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japão), operando com D_{65} (luz do dia) usando os parâmetros de cor CIELab, segundo Sobral et al., (2001). Os parâmetros a^* , b^* e L^* dos filmes foram determinados sobrepondo-se os filmes sobre um padrão branco e a diferença de cor foi expressa segundo a Equação 5.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5} \quad (5)$$

Onde $\Delta L^* = L^*_{\text{padrão}} - L^*_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{padrão}} - a^*_{\text{amostra}}$; $\Delta b^* = b^*_{\text{padrão}} - b^*_{\text{amostra}}$

A opacidade foi determinada segundo Sobral (2000) utilizando-se o programa do equipamento. Segundo este método, a opacidade é calculada como a relação entre a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto (Y_p) e sobre o padrão branco (Y_b), segundo a Equação 6.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (6)$$

2.3.1.7 Microestrutura dos filmes

Os estudos da microestrutura dos filmes foram realizados em filmes controle (pH 11,5) e com maior conteúdo de antimicrobianos, através da microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6060, Japão) operando a 10 kV. As amostras dos filmes foram colocadas em suporte de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro (Sputter Coater, SCDO50) para melhorar a condutibilidade, as fotografias foram tiradas com 2000x de ampliação.

2.3.1.8 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT- IV)

Os estudos da espectroscopia no infravermelho foram realizados em filmes controle (pH 11,5) e com maior conteúdo de antimicrobianos. Os filmes foram cortados em discos de 1 cm de diâmetro e analisados em equipamento espectrofotométrico na região espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , segundo Hoque et al. (2011).

2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com os ácidos orgânicos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de IPA incorporados com diferentes concentrações de ácido sórbico e benzóico frente aos microrganismos *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* foi realizada em triplicata através do método de difusão em discos segundo a CLSI (2003). As culturas de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* e *S. aureus* foram cultivadas e inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e a *Listeria monocytogenes* inoculadas em caldo BHI enriquecido com extrato de levedura 0,6% (p/v) (Yest Extract). Após 24 horas, as culturas foram padronizadas com uma densidade de células de 1 a 2.10^8 UFC mL^{-1} (McFarland 0,50). Um suabe estéril foi imerso na suspensão padronizada e brevemente espalhada sobre a superfície da placa de ágar Mueller-Hinton (MH).

Os filmes foram assepticamente cortados com tesouras estéreis em discos de 15 mm, então foram expostos à luz ultravioleta (UV) em capela de fluxo laminar (Labconco, Estados Unidos) durante 30 minutos, segundo metodologia descrita e adaptada de Cagri et al. (2001). Os discos foram adicionados à placa contendo o ágar MH inoculado com os diferentes microrganismos, com auxílio de uma pinça estéril. Como controle foram utilizados filmes de IPA elaborados em pH 5,2 e 11,5 para avaliar o efeito do pH sobre os microrganismos. As placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 24 horas. Os diâmetros do halo de inibição foram medidos perpendicularmente em mm e o resultado final foi expresso como a média de três medições.

2.5 Aplicação dos filmes de maior atividade antimicrobiana em carne bovina

Com base nos resultados obtidos no teste da atividade antimicrobiana, e considerando uma possível difusão dos agentes antimicrobianos a partir do filme elaborado a base de IPA, os filmes com maior capacidade de inibição foram aplicados em carne bovina inoculada com os microrganismos que foram inibidos neste teste.

A carne bovina foi cortada em pequenos pedaços (2,1 x 2,5 x 1,0 cm) de $5,0 \pm 0,2$ g utilizando uma faca de aço inoxidável estéril. Em seguida, cada pedaço foi imerso em solução de água peptonada 0,1% (p/v) contendo os inóculos dos microrganismos que foram inibidos pelos filmes incorporados com os diferentes agentes antimicrobianos, sendo homogeneizado à temperatura ambiente durante 1 minuto. Estes foram envoltos assepticamente, em forma de cruz, pelos filmes antimicrobianos cobrindo toda a superfície da carne. As amostras controle foram embaladas em filmes de polietileno. As amostras de carne foram colocadas em placas de Petri estéreis e armazenadas a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$. Todas as amostras foram avaliadas microbiologicamente periodicamente (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias), segundo metodologias adaptadas de EMIROGIU, et al. (2010); ZINOVIADOU et al. (2010) e ZINOVIADOU et al. (2009). A carne bovina foi caracterizada quanto sua composição proximal, segundo AOAC (2000) e quanto a sua qualidade microbiológica, segundo APHA (2001).

2.5.1 Análises microbiológicas da carne bovina embalada com os diferentes filmes

Durante o armazenamento, foram realizadas contagens dos microrganismos pelo método de plaqueamento em gotas, segundo Silva et al. (2001) com adaptações.

Os filmes foram removidos assepticamente das amostras de carne ($5,0 \pm 0,2$ g) e foram adicionados em 45 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril juntamente com a carne bovina e homogeneizadas durante 1 minuto a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas diluições em série (10^{-1} – 10^{-7}). As placas contendo os meios, foram divididas quatro setores (quadrante) e armazenadas durante 24 horas a 30-35°C antes de serem utilizadas para garantir a secagem rigorosa das placas. Em seguida 0,03 mL de cada diluição foram inoculados em cada quadrante, em triplicata. As placas foram mantidas em uma superfície plana, para absorção do inóculo pelo meio de cultura, durante 30 minutos. Então, foram incubadas invertidas durante 24 horas a 37°C. Os resultados foram expressos pela média da triplicata em UFC.g⁻¹.

2.6 Análise estatística

Os resultados das determinações físico-químicas, atividade antimicrobiana e o efeito dos filmes antimicrobianos (p/v na solução filmogênica) sobre a multiplicação de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em carne bovina dos filmes com e sem incorporação dos agentes antimicrobianos, foram analisados utilizando o teste de Tukey para comparação das médias.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do isolado protéico

O isolado protéico de anchoita seco à 40°C apresentou 88,8% de proteína, 1,3% de lipídeos e 1,0% de cinzas. Segundo Yeannes e Casales (1995) a composição proximal da anchoita varia em função das diferentes estações do ano, inverno e primavera, resultando em produtos com diferente teor protéico. Devido a este fato, a captura das anchoitas pode ter ocorrido em diferentes estações do ano, resultando nas diferenças anteriormente citadas. O método utilizado para extração, temperatura, força centrífuga utilizada para separação e uma relativa concentração de proteínas sarcoplasmáticas solúveis em água, entre outros podem ter contribuído para estes diferentes teores de isolado protéico encontrados (NOLSOE e UNDELAND, 2009; TASKAYA et al., 2009).

3.2 Caracterização dos filmes antimicrobianos

Os filmes a base de isolado protéico de anchoita incorporados com os diferentes ácidos orgânicos e sem adição de antimicrobianos (pH 11,5) (controle) apresentaram-se homogêneos e de fácil manuseio. Exceto, os filmes sem antimicrobianos solubilizados em pH 11,5 e formados em pH 5,2. Neste pH, ocorreu problema quanto a formação de ligações S-S na matriz protéica, enfraquecendo desta forma a estrutura dos filmes (MCHUGH e KROCHTA, 1994) . A Tabela 6, apresenta as propriedades mecânicas e físico-químicas dos filmes a base de IPA incorporados com diferentes antimicrobianos e sem adição destes em pH 11,5 e 5,2 (controles).

3.2.1 Análises microbiológicas

Não foram detectados nas análises microbiológicas os microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos nas amostras dos filmes com e sem incorporação de antimicrobianos. Em relação a bolores e leveduras, foi observado 15 UFC.g⁻¹ e 32 UFC.g⁻¹(estimada), respectivamente. A elaboração dos filmes com e sem adição de agentes antimicrobianos é um processo no qual a solução filmogênica é exposta a condições extremas de pH. A grande maioria dos microrganismos se multiplica melhor em valores de pH em torno de 7,0 sendo as bactérias mais exigentes que bolores e leveduras (JAY, 2005). Este fato foi verificado no presente estudo, no qual houve multiplicação apenas para bolores e leveduras. Os filmes contendo os agentes antimicrobianos apresentaram menor multiplicação de bolores e leveduras comparados aos filmes controle, indicando o efeito de inibição destes nos filmes.

3.2.2 Espessura

A Tabela 6 apresenta a espessura dos filmes elaborados com e sem adição dos agentes antimicrobianos. Os filmes elaborados apresentaram aumento na espessura, na medida em que ocorreu aumento na concentração do agente antimicrobiano adicionado ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Propriedades físico-químicas de filmes a base de isolado protéico de anchoita com e sem a adição de antimicrobianos

AM (%) (p/v)	Espessura (mm)	Solubilidade (%)	PVA (gmm.m ² dkPa ⁻¹)	Resistência a tração (MPa)	Elongação (%)
pH 11,5	0,150 ± 0,050 ^d	27,7 ± 1,9 ^e	8,4 ± 0,1 ^c	3,9 ± 0,0 ^a	9,0 ± 1,8 ^f
AS 0,50	0,155 ± 0,000 ^d	31,5 ± 0,5 ^{de}	14,9 ± 0,8 ^b	2,6 ± 0,1 ^b	28,3 ± 0,3 ^e
AS 0,75	0,172 ± 0,030 ^c	35,0 ± 0,1 ^{cd}	15,3 ± 0,9 ^b	1,4 ± 0,0 ^c	43,2 ± 0,7 ^d
AS 1,50	0,185 ± 0,040 ^b	65,3 ± 0,7 ^a	19,3 ± 0,9 ^a	1,1 ± 0,1 ^c	121,3 ± 2,0 ^a
AB 0,50	0,153 ± 0,000 ^d	34,8 ± 1,2 ^{cd}	15,9 ± 0,6 ^b	3,8 ± 0,1 ^a	28,7 ± 0,2 ^e
AB 0,75	0,202 ± 0,230 ^a	39,9 ± 2,00 ^c	19,1 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,3 ^b	57,9 ± 0,8 ^c
AB 1,50	0,212 ± 0,340 ^a	46,7 ± 0,0 ^b	21,0 ± 1,3 ^a	1,2 ± 0,0 ^c	97,0 ± 2,9 ^b

AM – antimicrobianos; AS – ácido sórbico; AB – ácido benzóico; Média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Filmes elaborados com 0,50 e 1,50% de ácido sórbico apresentaram um aumento na espessura de 0,155 a 0,185 mm, diferindo significativamente ($p < 0,05$), o mesmo comportamento foi observado para os filmes elaborados com ácido benzóico. Segundo Shimazu et al. (2007) com o aumento no teor de sólidos totais secos adicionados na solução filmogênica, tal como o aumento do conteúdo dos antimicrobianos, resulta em um acréscimo na espessura do filme. Segundo Embuscado e Huber (2009) os filmes biodegradáveis, geralmente, apresentam espessura menores ou iguais que 0,300 mm, sendo valores inferiores a estes encontrados no presente estudo.

3.2.3 Solubilidade em água

Os filmes de isolado protéico de anchoita com e sem adição dos agentes antimicrobianos, permaneceram íntegros após a imersão em água durante 24 horas, devido a estabilidade da rede protéica destas formulações. A Tabela 6 apresenta a solubilidade dos filmes à base de IPA com e sem adição de antimicrobianos.

Estes dados indicam que a incorporação dos diferentes ácidos orgânicos apresentou efeito significativo sobre a solubilidade dos filmes a base de isolado protéico de anchoita ($p < 0,05$). Segundo Baird-Parker (1980) os ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como o benzóico e sórbico, possuem maior solubilidade, o que foi verificado no presente estudo, no qual os filmes contendo o maior teor de ácido sórbico (AS) e ácido benzóico (AB) apresentaram maior solubilidade 65,3 e 46,7%, respectivamente, em relação aos demais filmes elaborados. Manab et al. (2007) em seus estudos, verificaram que filmes de isolado protéico de soro de leite incorporados com ácido propiônico (AP) e AB apresentaram 44,4% e 40,2% de solubilidade em água. Ozdemir e Floros (2008) elaboraram filme de isolado protéico de soro de leite incorporado com diferentes concentrações de sorbato de potássio. Eles verificaram que o maior teor de antimicrobiano adicionado, resultou em 50,8% de solubilidade em água.

O filme elaborado sem adição dos agentes antimicrobianos (pH 11,5), apresentou solubilidade de 27,7%, devido as características hidrofílicas da proteína isolada de anchoita e do plastificante adicionado. Tongnuanchan et al. (2011) observaram que os filmes à base de isolado protéico do músculo de tilápia tinham solubilidades entre 21,4% e 56,0%. O isolado protéico de anchoita é caracterizado por apresentar um maior conteúdo de aminoácidos polares, o que foi verificado na Tabela 3 (Artigo 1), contribuindo para esta solubilidade acentuada.

O uso de filmes à base de isolado protéico de anchoita incorporados com os ácidos orgânicos em alimentos depende das características do mesmo, pois, em alguns casos, a resistência de filmes antimicrobianos a água é desejável. A solubilidade elevada faz com que aumente a difusão do agente antimicrobiano para a totalidade do alimento, resultando em baixa concentração deste na superfície do mesmo (OZDEMIR e FLOROS, 2008). Em geral a maior solubilidade dos filmes, indica menor resistência à água e maior permeabilidade ao vapor de água. Entretanto, a elevada solubilidade e/ou permeabilidade ao vapor de água do filme pode ser uma vantagem para aplicações específicas (RAMOS et al., 2012).

3.2.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os filmes contendo 0,50%, 0,75% e 1,50% de AS apresentaram valores médios de PVA de 14,9, 15,3 e 19,3 g.mm (m² d kPa)⁻¹, como demonstrado pela Tabela 6. O aumento da concentração de AS de 0,50% para 0,75% não apresentou diferença significativa da PVA, mas o aumento para 1,50% de AS resultou em

diferença significativa quando comparado aos demais ($p < 0,05$). Os filmes contendo 0,50%, 0,75% e 1,50% de AB apresentaram valores médios de PVA de 15,5, 19,0 e 21,0 g.mm (m² d kPa)⁻¹. O acréscimo de 0,50 para 0,75% apresentou diferença significativa na PVA ($p < 0,05$), contudo não houve diferença significativa entre os conteúdos de 0,75 e 1,50% de AB.

Todos os filmes elaborados com antimicrobianos diferiram significativamente do controle (pH 11,5) o qual apresentou PVA de 8,4 g.mm (m² d kPa)⁻¹. Cagri et al. (2001) elaboraram filmes de isolado protéico de soro de leite incorporados com ácido sórbico, no qual verificaram que a adição de 1,50% de AS resultou em 44,4 g.mm (m² d kPa)⁻¹ de PVA, sendo esse valor superior a 19,3 g.mm (m² d kPa)⁻¹ encontrado no presente estudo. Os filmes à base de isolado protéico de soro de leite adicionados de ácido sórbico podem ser facilmente penetrados pelo vapor de água, quando comparados aos filmes à base de IPA contendo o mesmo agente antimicrobiano.

Geralmente, os filmes à base de proteínas de pescado, tendem a ser permeáveis devido ao elevado número de aminoácidos polares em sua constituição, que contribuem pela afinidade entre filme e o vapor de água (GARCÍA e SOBRAL 2005). A elaboração de filmes a base de isolado protéico de anchoita incorporados com ácidos orgânicos, resulta em filmes de maior permeabilidade ao vapor de água, quando comparada aos filmes sem adição destes. A incorporação de ácidos orgânicos pode aumentar a permeabilidade ao vapor de água, pois enfraquece a estrutura do filme, o que aumenta a mobilidade da água (MANAB et al., 2011; CAGRI et al., 2001).

3.2.5 Propriedades mecânicas

A Tabela 6 apresenta as propriedades mecânicas, resistência à tração e alongação, dos filmes de IPA incorporados com agentes antimicrobianos. Com o acréscimo nas concentrações dos agentes antimicrobianos de 0,50% para 1,50% ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na alongação de 28,3% para 121,3% e de 28,7% para 97,0% para os filmes incorporados com AS e AB, respectivamente. Contudo, a resistência a tração (RT) dos filmes diminuiu significativamente com os níveis crescentes de AS e AB ($p < 0,05$). A RT dos filmes contendo 0,50% de AB (3,8 MPa) não apresentou diferença significativa do filme elaborado sem a adição dos agentes antimicrobianos em pH 11,5 (3,9 MPa) ($p < 0,05$). Estes resultados estão de acordo com Cagri et al. (2004), que afirmaram que a incorporação de diferentes aditivos, geralmente reduz a RT dos filmes. Segundo Zhong et al. (2011), as

características das soluções ácidas, tais como força iônica e grau de dissociação, influenciam as propriedades dos filmes.

Dentre as propriedades estudadas em filmes, a resistência a tração e a alongação são as respostas comumente relatadas para descrever as propriedades mecânicas dos filmes, pois estas são determinantes na aplicação do mesmo. Devido a estes fatores, estas serão estudadas no presente trabalho. Estas propriedades são influenciadas pela interação da proteína, água, plastificante e agente antimicrobiano (SIVAROUBAN et al., 2008).

Os filmes contendo 0,50 e 0,75% de AS apresentaram menor resistência a tração (2,6 e 1,4 MPa) e maior alongação para 1,50% de AS, comparados aos filmes contendo os mesmos conteúdos de AB. Este fato se deve porque o ácido sórbico possui a estrutura de uma cadeia linear, penetrando facilmente nas cadeias de proteína, em comparação ao ácido benzóico que possui um anel de benzeno. Conseqüentemente, o AS oferece maior mobilidade entre as cadeias de proteína, fazendo com que o filme apresente menor RT e maior flexibilidade (CAGRI et al., 2001).

Ramos et al. (2012) em seus estudos com filmes elaborados a base de isolado protéico de soro de leite, incorporados com ácido propiônico (PRO), verificaram que a adição deste na solução filmogênica resulta em filmes com maior variação nas propriedades mecânicas, sendo maior para a alongação (93%) e menor para resistência a tração (0,1 MPa). Estes resultados são inferiores, aos encontrados no presente estudo no qual filmes incorporados com 1,50% de AS e AB apresentaram valores de 1,1 MPa e 1,2 MPa para RT, 121,3% e 97,0% para alongação, respectivamente. A redução significativa na resistência a tração em filmes incorporados com antimicrobianos também foi observada por Chana-Thaworn et al. (2011); Rojas-Grau et al. (2007) e Fang et al. (2002).

3.2.6 Cor e Opacidade

A cor do filme pode influenciar a aceitabilidade de um produto pelo consumidor (SIVAROUBAN et al., 2008). Neste estudo, a cor foi representada como diferença de cor (ΔE^*). A Figura 13 apresenta a diferença de cor e a opacidade dos filmes de IPA com e sem agentes antimicrobianos.

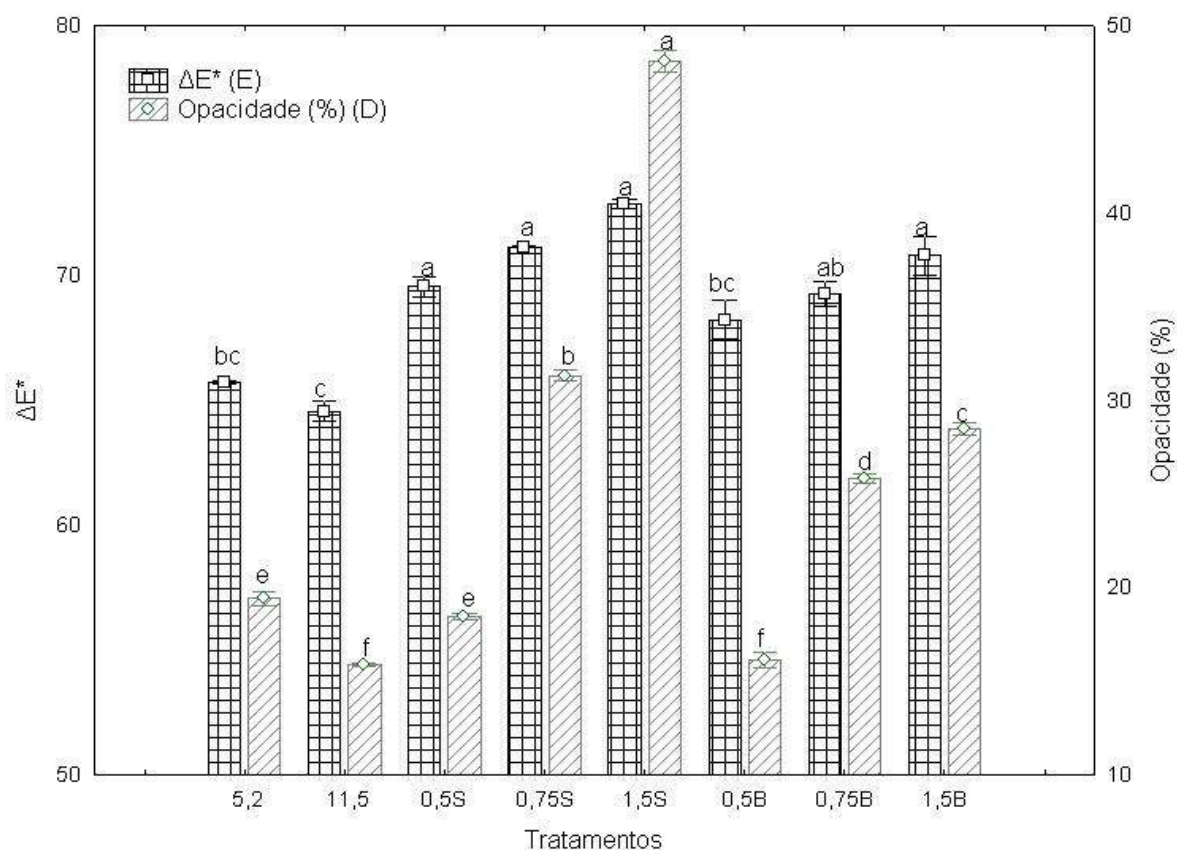


Figura 13 - Diferença de cor (ΔE^*) e opacidade (Y) dos filmes elaborados com e sem agentes antimicrobianos

Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa, entre os diferentes antimicrobianos utilizados. 5,2 - pH 5,2 (controle sem adição de agente antimicrobiano); 11,5 - pH 11,5 (controle sem adição de agente antimicrobiano); 0,50S, 0,75S, 1,5S – 0,50%, 0,75% e 1,50% de ácido sórbico (AS); 0,50B, 0,75B, 1,5B – 0,50%, 0,75% e 1,50% de ácido benzóico (AB); (ΔE^*) (E) valores referentes a diferença de cor apresentada no eixo Y esquerdo; Opacidade (D) valores referentes a opacidade apresentada no eixo Y direito.

Os valores de diferença de cor e de opacidade dos filmes controle (pH 5,2 e pH 11,5) e dos filmes contendo 0,50% e 0,75% de ácido benzóico, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), foram mais claros (menor ΔE^*), que os demais filmes elaborados. A diferença de cor dos filmes elaborados com 0,50%, 0,75%, 1,50% de AS e 0,75% e 1,50% de AB não foi significativamente diferente ($p < 0,05$), entretanto estes filmes apresentaram mais escuros (maior valor ΔE^*), em relação aos demais filmes elaborados. Ramos et al. (2012) elaboraram filmes a base de isolado protéico de soro de leite (IPSL) incorporados com ácido láctico e ácido propiônico com ΔE^* de 6,4 e 9,4. Estes filmes foram mais claros, que os filmes elaborados com isolado protéico de anchoita incorporados com os ácidos orgânicos os quais apresentaram uma variação ΔE^* de 64,1 a 72,9 para o controle (pH 11,5) 1,50% de AS neste estudo.

Além disso, o músculo da anchoita apresenta uma coloração escura, resultando em aumento do parâmetro ΔE^* .

Em algumas aplicações de embalagens em alimentos, a transparência é uma característica importante (YOSHIDA e ANTUNES, 2009). A adição de agentes antimicrobianos na solução filmogênica reduziu a transparência dos filmes (Figura 11), pois eles bloquearam a passagem da luz através do filme de uma forma mais eficaz, aumentando a opacidade. Han e Floros (1997) observaram um decréscimo na transparência do filme de polietileno de baixa densidade com a adição de sorbato de potássio. Segundo Flores et al. (2007) o maior acréscimo de sorbato, sal do ácido sórbico, resultou em acréscimo de cor e reduziu o grau de transparência em filmes a base de amido de tapioca.

3.2.7 Microestrutura dos filmes

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para examinar as superfícies dos filmes controle (pH 11,5) e com maior conteúdo de agentes antimicrobianos, ácido sórbico e ácido benzóico, para melhor elucidar a relação entre as características de superfície e as propriedades dos filmes. O filme controle, apresentado na Figura 14a, apresentou uma superfície compacta e lisa, sugerindo que foi formada uma matriz ordenada, comparável aos filmes elaborados a partir de isolado protéico de soro de leite e gelatina (JIANG et al., 2010).

O filme contendo 1,50% de ácido sórbico, Figura 14b, apresentou pequenos poros uniformemente distribuídos ao longo do filme. Estas discontinuidades, na estrutura do filme, possivelmente, proporcionaram a formação de vias preferenciais para difusão do vapor de água, durante a secagem para eliminação do ar incorporado durante a agitação no processo de elaboração dos filmes, o que explicaria a maior PVA do filme, quando comparado ao filme controle (pH 11,5) (BENAVIDES et al., 2011; BODINI, 2011).

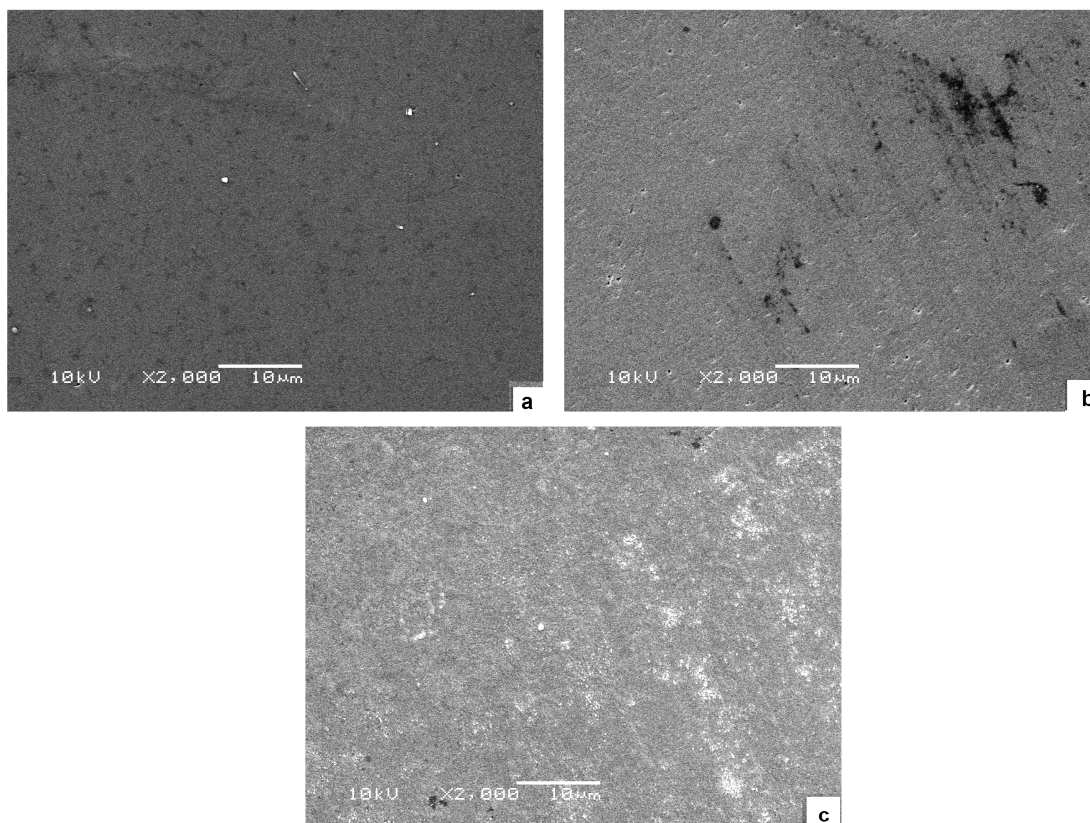


Figura 14 - Micrografias da superfície dos filmes (a) controle (pH 11,5); (b) 1,50% de ácido sórbico; (c) 1,50% de ácido benzóico.

O filme contendo 1,50% de ácido benzóico, Figura 14c, apresentou uma superfície rugosa, a qual proporciona facilidade na permeação do vapor de água, resultando em um acréscimo na PVA. O efeito da incorporação de agentes ativos na matriz polimérica é influenciado por diversos fatores, tais como tipo e tamanho da molécula, além da interação com a macromolécula. Desta forma, os estudos relacionados à avaliação da microestrutura dos filmes biodegradáveis em função da incorporação de agentes ativos apresentam diferentes resultados (BENAVIDES et al., 2011; ALTIOK et al., 2010).

3.2.8 Análise de espectroscopia de infravermelho (FT-IV)

Através da análise espectroscópica, pôde-se observar as principais características estruturais dos filmes elaborados e as interações entre o IPA e os antimicrobianos. Os espectros FT-IV dos filmes controle (pH 11,5) e dos filmes incorporados com os agentes antimicrobianos ácido sórbico e ácido benzóico são apresentados na Figura 15.

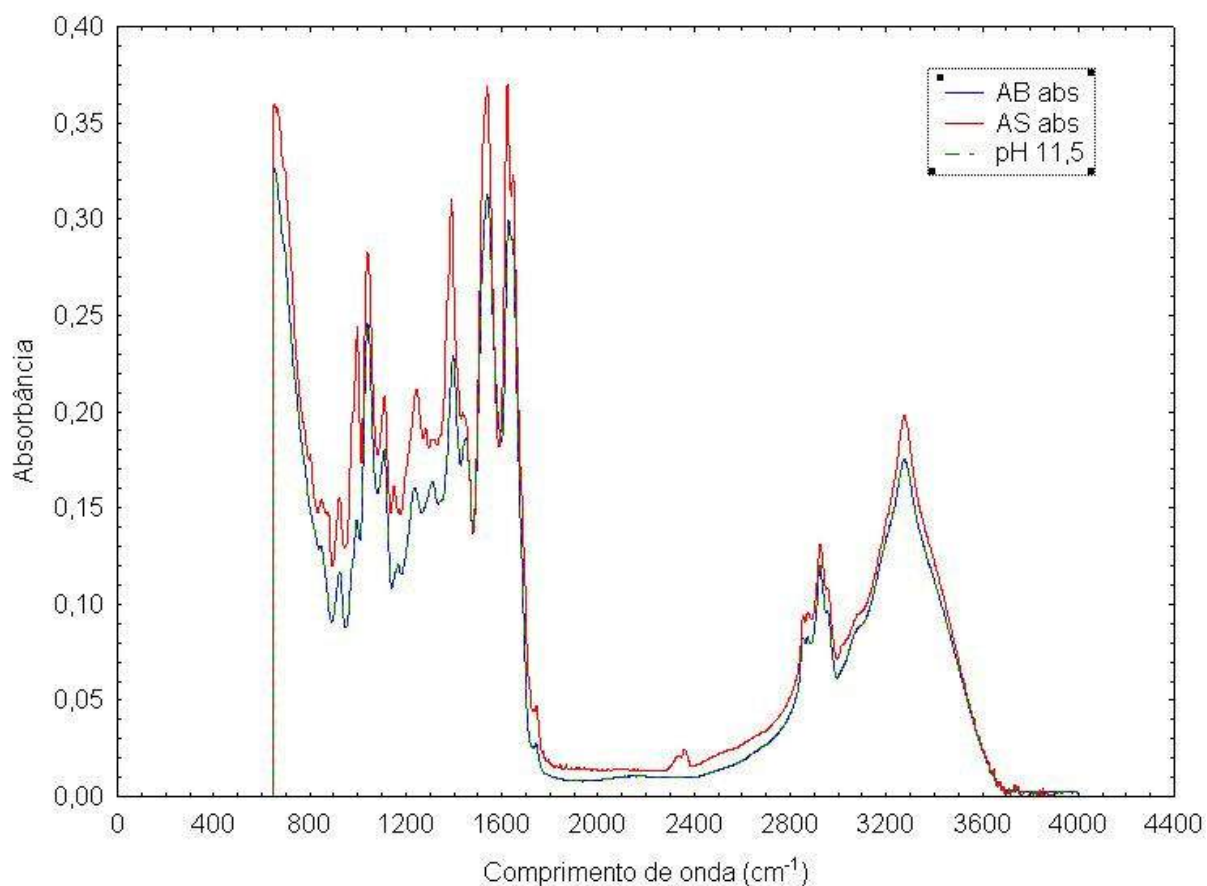


Figura 15 - Espectros de absorção da região do infravermelho dos filmes de isolado protéico de anchoita incorporados com ácido sórbico (1,50%), ácido benzóico (1,50%) e o controle (pH 11,5).

Nos espectros de todos os filmes foram observadas bandas relacionadas com o estiramento C=O entre 1600-1610 cm^{-1} (amida I), que está de acordo com AEWSIRI et al. (2009). A banda em 1550 cm^{-1} corresponde a NH (amida II) e 1250 cm^{-1} (amida III) representa as vibrações do plano C-N e grupos N-H da banda amida. O pico situado em torno de 1000 cm^{-1} pode estar relacionado com as interações entre o plastificante (grupo OH do glicerol) e a estrutura do filme (BERGO e SOBRAL, 2007). A amplitude do pico amida I e II aumentou com a adição do ácido sórbico no filme (absorbância 0,37), comparada com o controle (absorbância 0,29-0,30) e o filme contendo ácido benzóico (absorbância 0,30-0,29). Em geral, o filme contendo AS apresentou amplitude do pico maior que os demais filmes elaborados. Estes resultados sugerem que houve uma interação entre o ácido benzóico e proteína, pois as amplitudes dos picos foram semelhantes devido a interação entre eles.

Segundo Chen et al. (1996) as diferentes interações entre as macromoléculas e os antimicrobianos, resultam em taxas de difusão, graus de inibição e resultados

diferentes. O espectro da região do infravermelho do filme controle e incorporado com AB indicam uma interação entre eles. Esta interação, pode ter influenciado no potencial antimicrobiano do ácido benzóico o qual diminui em 2 e 1 log a multiplicação da *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 ao longo dos 12 dias de armazenamento, sempre em relação ao tempo zero de inoculação.

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com os ácidos orgânicos

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes realizada pelo método disco difusão, com e sem incorporação de ácido sórbico e ácido benzóico são apresentados na Figura 16.

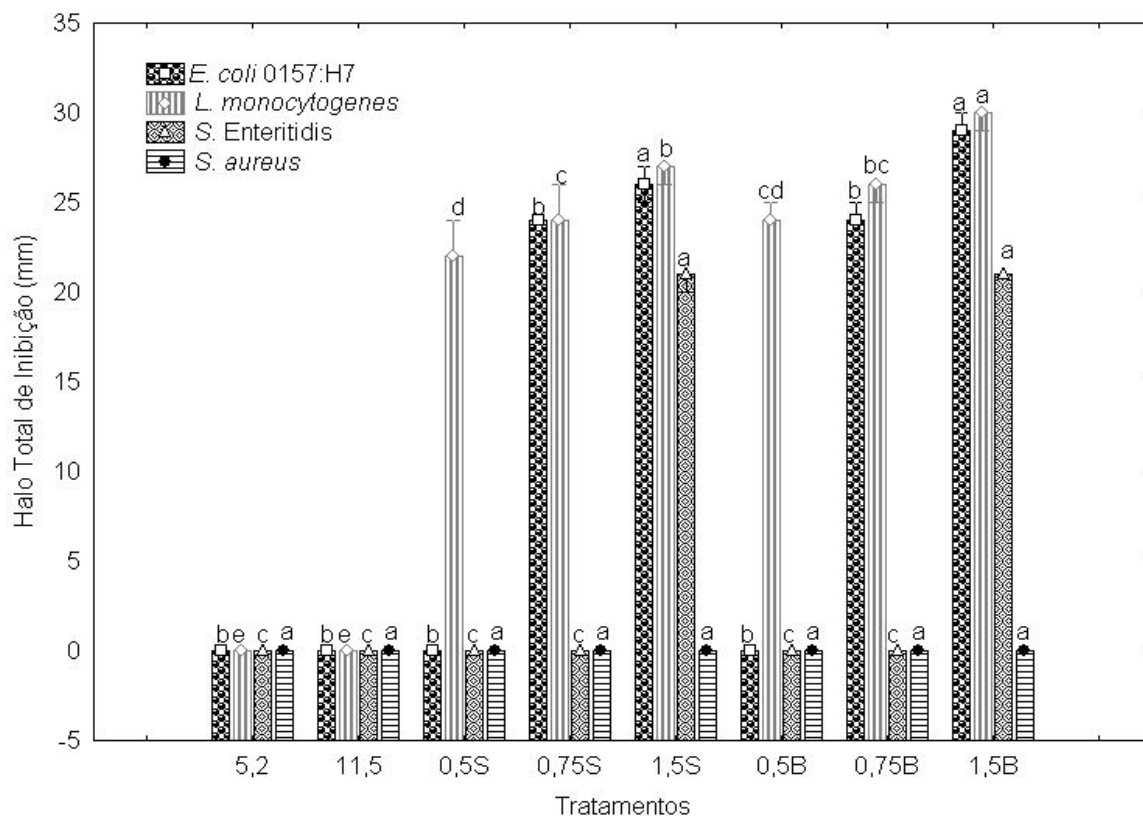


Figura 16 – Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de anchoita com ou sem incorporação de agentes antimicrobianos.

Letras minúsculas iguais para o mesmo microorganismos indicam que não há diferença significativa, entre os diferentes antimicrobianos utilizados. 5,2 - pH 5,2 (controle sem adição de agente antimicrobiano); 11,5 - pH 11,5 (controle sem adição de agente antimicrobiano); 0,50S, 0,75S, 1,5S – 0,50%, 0,75% e 1,50% de ácido sórbico (AS); 0,50B, 0,75B, 1,5B – 0,50%, 0,75% e 1,50% de ácido benzóico (AB).

Os resultados obtidos demonstraram que os filmes controle não promoveram inibição na multiplicação dos microrganismos testados. Indicando, que somente o pH destes filmes, sem adição de agente antimicrobiano, não é efetivo para a inibição da multiplicação dos microrganismos testados. O mesmo comportamento foi verificado no estudo de Pérez et al. (2011), onde filmes controle pH 5,2 e 6,0 sem adição de agentes antimicrobianos não apresentaram efeito inibitório.

O AS e o AB são ácidos orgânicos mais eficazes na forma não-dissociada, devido a sua maior capacidade de penetrar na membrana citoplasmática das bactérias (CAGRI et al., 2001). Em pH 5,0 cerca de 30,0% do ácido sórbico e 12,8% do ácido benzóico estão na forma não-dissociada (MASSAGUER, 2006). Entretanto, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os filmes contendo 1,50% de AS e AB na inibição da *Escherichia coli* O157:H7 e 0,75% de AS e AB na inibição de *Listeria monocytogenes*. Segundo Manab et al. (2011) e Mani-López et al. (2011) a inibição da multiplicação dos microrganismos por ácidos orgânicos, ocorre devido a liberação de prótons no citoplasma e o acúmulo de ânions, que fazem com que a velocidade da síntese de macromoléculas seja diminuída, afetando o transporte de nutrientes através da membrana celular.

Segundo Beales (2004) a eficácia dos ácidos orgânicos não depende somente dos valores do pKa, mas também do tipo de microrganismo testado. A *Listeria monocytogenes* é um bactéria Gram-positiva, que possui uma parede celular composta por grossas camadas de peptidoglicano (20 a 80 nm) depositada sobre membrana citoplasmática. Essa substância é responsável pela morfologia das bactérias e também pela sua resistência a fatores físicos como pressão, congelamento entre outros, mas sensíveis aos agentes químicos (TONDO e BARTZ, 2011; JAY, 2005). Este fato, explica a inibição da *L. monocytogenes* por 0,50% e 0,75% de ácido sórbico e ácido benzóico, entretanto estas concentrações não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), quanto a inibição. Todavia, os demais microrganismos testados não apresentaram inibição para a mínima concentração destes antimicrobianos ($p < 0,05$).

Cagri et al. (2001) elaboraram filmes a base de isolado protéico de soro de leite incorporados com diferentes conteúdos de AS. Este agente antimicrobiano foi testado frente a *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*, onde apresentou um halo de inibição, para a maior concentração de AS, de 21,3 e 32,0 mm, respectivamente. Para elaboração destes filmes, eles utilizaram como agentes acidificantes, para ajuste de pH, o ácido láctico e o ácido acético que pode ter contribuído sinergisticamente para

essas inibições, justificando a maior inibição quando comparada com o presente estudo. Entretanto, Benavides et al. (2011) verificaram que filmes incorporados com 1,50% (p/v) de óleo de orégano resultava em um halo total de inibição de 22,8 mm frente a *L. monocytogenes*, sendo esta inibição inferior ao encontrado neste estudo, o qual apresentou um halo total de inibição de 30,0 mm para 1,50% de AB.

A *S. Enteritidis* foi inibida pela maior concentração de AB e AS (1,50%), entretanto o tipo de antimicrobiano não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao diâmetro do halo total de inibição. Segundo Cagri et al. (2001) a quantidade difundida de antimicrobianos, incorporados com 0,50% ou 0,75% AS, através dos discos de filme a base de isolado protéico de soro de leite foi muito baixa para inibir *S. Typhimurium*.

Segundo Manab et al. (2011) a difusão dos agentes antimicrobianos, a partir do disco do filme, depende do tamanho, forma e polaridade da molécula de difusão, bem como da estrutura química do filme e do grau de ligações moleculares. Na literatura, existem muitos estudos de filmes antimicrobianos elaborados à base de isolado protéico de soro de leite e de soja. Entretanto, há poucas pesquisas envolvendo filmes à base de proteína de pescado como macromolécula para o desenvolvimento de filmes antimicrobianos o que dificulta comparações entre as pesquisas. O *S. aureus*, apesar de ser um microrganismo Gram-positivo, não apresentou inibição nos diferentes níveis e tipos de agentes antimicrobianos testados. Segundo Silveira (2005) os sais de ácido sórbico, sorbatos, inibem *S. aureus*, bactérias psicrotróficas entre outros.

A atividade antimicrobiana estudada no presente estudo foi baseada na medição da zona de inibição dos discos do filme, onde a multiplicação dos patógenos foi inibida (RAMOS et al. 2012). A forma da molécula do agente antimicrobiano (linear, ramificada, cíclica) pode ter impacto na taxa de difusão deste. Chen (1996) mediu a taxa de difusão de ácido sórbico e ácido benzóico incorporado em solução filmogênica de água, glicerol e quitosana onde 57% de AS e 65% de AB foram liberados pelos filmes. As diferentes interações de AS e AB nos filmes a base de IPA, resultam em taxas de difusão, graus de inibição e resultados diferentes. O efeito dos agentes antimicrobianos destes depende da interação deles com a macromolécula utilizada na elaboração do filme.

3.4 Aplicação dos filmes de maior atividade antimicrobiana em carne bovina

Os filmes incorporados com 1,50% de AS e AB obtiveram a maior halo total de inibição frente aos microrganismos *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes*. Devido a isto, estes filmes foram utilizados como embalagem ativa da carne bovina inoculada com $4,89 \cdot 10^4$ UFC. mL⁻¹ de *E. coli* O157:H7 e $4,67 \cdot 10^5$ UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* para avaliar o efeito antimicrobianos destes na superfície da carne bovina.

A carne bovina continha 70,2% de umidade, 22,3% de proteína, 6,6% de lipídeos e 1,1% de cinzas. Estes valores são semelhantes aos descritos pela TACO (2011) para carne bovina com baixo teor de lipídeos, a qual apresenta 69,5% de umidade, 21,6% de proteína, 7,8% de lipídeos e 1,0% de cinzas. Devido à elevada porcentagem de umidade e nutrientes, a carne bovina é um excelente meio de cultura para sobrevivência e multiplicação de grande número de microrganismos capazes de causar toxinfecções no homem (JAY, 2005; PARDI et al., 2001). Além disso, a composição dos alimentos também pode afetar o mecanismo de migração do agente antimicrobiano para a estrutura dos alimentos (ZINOVIADOU et al., 2009).

As análises realizadas na carne bovina não detectaram bolores e leveduras, entretanto foram observados 20 UFC.g⁻¹ (estimada) de psicrotróficos 13 UFC.g⁻¹ (estimada) de mesófilos. Pode-se atribuir estes resultados à qualidade da matéria-prima devidamente manipulada, processada e armazenada em temperaturas adequadas, confirmando o que foi relatado por Forsythe (2002).

A Figura 17 apresenta a contagem pelo método de plaqueamento em gotas de microrganismos das amostras de carne bovina inoculadas com *E. coli* e *L. monocytogenes* e embaladas com e sem filmes antimicrobianos durante o armazenamento a 5,0°C. Como pode ser visto, a partir da Figura 17, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os microrganismos *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, mas não entre os filmes antimicrobianos e o controle no primeiro dia de armazenamento (dia zero). Zinoviadou et al. (2010) em seus estudos verificaram que no dia zero de armazenamento não houve diferença significativa entre os filmes controle e incorporados com antimicrobianos, indicando que a presença de proteína, plastificante ou antimicrobianos não afetaram a multiplicação das bactérias estudadas, logo que foram embalados.

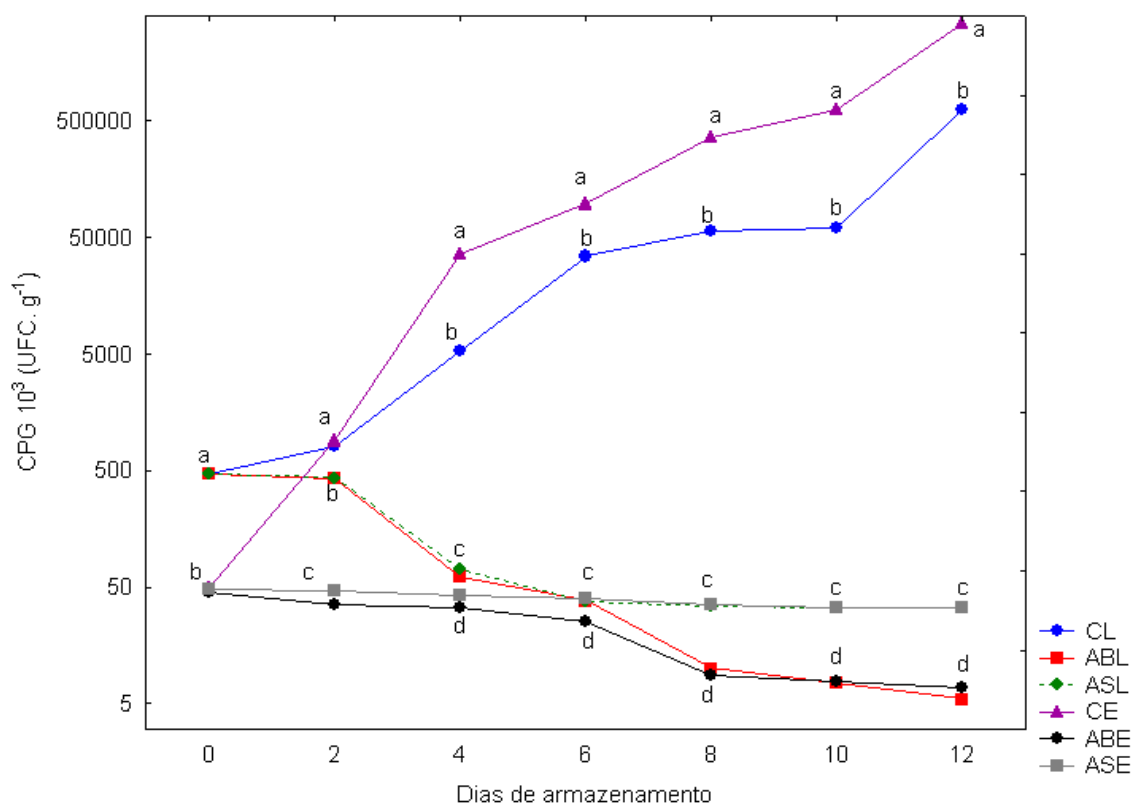


Figura 17 – Efeito dos filmes antimicrobianos (p/v na solução filmogênica) sobre a multiplicação de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em carne bovina.

Letras minúsculas iguais no mesmo dia de armazenamento indicam que não há diferença significativa, entre os diferentes antimicrobianos utilizados e o controle. CL – controle filme de polietileno/carne bovina inoculada com *L. monocytogenes*; CE – controle filme de polietileno/ carne bovina inoculada com *E. coli* O157:H7; ABL – filme com 1,50% ácido benzóico/ carne bovina inoculada com *L. monocytogenes*; ASL - filme com 1,50% ácido sórbico/ carne bovina inoculada com *L. monocytogenes*; ABE - filme com 1,50% ácido benzóico/ carne bovina inoculada com *E. coli* O157:H7; ASE - filme com 1,50% ácido sórbico/ carne bovina inoculada com *E. coli* O157:H7; CPG: contagem de microrganismos pelo método de plaqueamento em gotas.

Houve um aumento na população de *L. monocytogenes* e de *E. coli* O157:H7 para o controle do 2° ao 12° dia de armazenamento, em relação as demais amostras embaladas com filmes antimicrobianos. O controle, para os diferentes microrganismos, foi um filme de polietileno, o qual não estava incorporado com agentes antimicrobianos, o que indica que a presença de uma embalagem convencional, ou filme sem antimicrobiano, aliada à temperatura de refrigeração, não inibiria a multiplicação de qualquer uma das bactérias estudadas (EMIROGLU et al., 2010; ZINOVIADOU et al., 2009). Segundo Franssen e Krochta (2003), a adição de agentes antimicrobianos em filmes reduz a multiplicação de microrganismos patógenos na superfície dos alimentos.

No 2° dia de armazenamento os filmes contendo AB e AS, aplicados em carne inoculada com *L. monocytogenes*, não apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na

multiplicação da mesma. O mesmo comportamento foi verificado para os filmes incorporados com AB e AS utilizados para o controle de *E. coli* O157:H7. Segundo Harris e Thorarensen (2004) os antimicrobianos podem agir sobre as bactérias patógenas a partir da interrupção de sua multiplicação, exercendo um efeito bacteriostático. Este comportamento foi observado no presente estudo até o 4º dia de armazenamento, no qual a multiplicação da *E. coli* O157:H7 foi significativamente igual ($p < 0,05$) para as amostras embaladas com AS e AB.

Entretanto, os filmes de AB e AS reduziram a multiplicação da *L. monocytogenes* de $4,30 \cdot 10^5$ e $4,33 \cdot 10^5$ UFC.g⁻¹ do 2º dia, para $6,11 \cdot 10^4$ e $7,11 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ no 4º dia de armazenamento. A *L. monocytogenes* é um microrganismo Gram-positivo, que possui uma parede celular na qual os antimicrobianos se difundem com maior facilidade, comparada aos microrganismos Gram-negativos, eles são mais susceptíveis a ação de determinados antimicrobianos (JAY, 2005; TONDO e BARTZ, 2011). No 6º dia de armazenamento, os diferentes antimicrobianos tiveram o mesmo efeito de inibição para a *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* ($p < 0,05$). Contudo, neste tempo de armazenamento a *E. coli* O157:H7 e a *L. monocytogenes* apresentaram uma diferença de 3 log UFC.g⁻¹, comparadas com as amostras controle.

A partir do 8º até o 12º dia de armazenamento, os filmes contendo AB inibiram significativamente os microrganismos *E. coli* O157:H7 e a *L. monocytogenes* em 1 log e 2 log UFC.g⁻¹, em relação ao dia zero de incubação. O AB apresentou um comportamento bactericida, pois ocorreu uma diminuição na multiplicação dos microrganismos, enquanto que AS apresentou um comportamento bacteriostático no qual a população de microrganismos não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), desde o 6º dia de armazenamento. Zivanovic et al. (2005), em seus estudos com filme à base de quitosana, verificaram a diminuição de 1 a 3 unidades logarítmicas em números de patógenos, sendo este número semelhante ao encontrado neste trabalho. Ousallah et al. (2004) relataram uma redução de 0,95 log de *Pseudomonas* spp. em músculo de carne, revestido com filmes à base de proteínas de leite incorporados com 1% (p/v) óleo de orégano, após 7 dias de armazenamento a 4 °C.

Zinoviadou et al.(2009) verificaram que as embalagens de filmes à base de isolado protéico de soro de leite incorporado com óleo de orégano, resultaram na redução de 3 log UFC.g⁻¹ na contagem total de células viáveis em cortes de carne bovina, comparado ao controle no 8º dia de armazenamento sob refrigeração. No presente estudo também foi verificada a redução de 3 log UFC.g⁻¹ de *L.*

monocytogenes na carne bovina embalada com AS e AB no 8º dia de armazenamento a 5°C, em relação ao controle.

Em relação ao filme de polietileno, controle, os filmes contendo AS frente as bactérias a *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* obtiveram uma contagem 5 e 4 log UFC.g⁻¹ menores, respectivamente. O AB frente a estas bactérias, obtiveram uma contagem 6 e 5 log UFC.g⁻¹ ao final do 12º dia de armazenamento, respectivamente. Estes resultados comprovaram que os filmes elaborados à base de isolado protéico de anchoita incorporados com ácido sórbico e ácido benzóico foram eficazes no controle da multiplicação de *Escherichia coli* O157:H7 e a *Listeria monocytogenes*.

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a incorporação de distintos compostos antimicrobianos em concentrações diferentes, apresenta diferentes graus de eficácia frente aos microrganismos alvo. A maior atividade antimicrobiana dos filmes à base de isolado protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*) incorporados com a maior concentração (1,50%) de ácido sórbico ou ácido benzóico foi demonstrada contra *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis.

O mesmo efeito inibitório foi observado quando os filmes antimicrobianos foram aplicados em carne bovina contra *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, sendo que os filmes incorporados com ácido benzóico, apresentaram maior inibição quando comparados aos filmes contendo ácido sórbico e os filmes controle para os dois microrganismos testados

As propriedades dos filmes de isolado protéico foram afetadas pela adição de diferentes concentrações do ácido sórbico e ácido benzóico. A adição de maiores concentrações de ácido sórbico e ácido benzóico mostrou maior alongação, permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, diferença de cor e opacidade, quando comparado aos filmes com controle e incorporados com ácido benzóico. Entretanto, ocorreu uma diminuição na resistência a tração dos filmes antimicrobianos. Foi observada uma mudança nas interações intermoleculares entre as moléculas de isolado protéico e ácido sórbico e benzóico conforme determinado pela espectroscopia no infravermelho. As imagens de microscopia eletrônica de varredura na superfície do filme revelaram microporos nos filmes contendo 1,50% de ácido sórbico..

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne. Produção e Exportação Mundial de Carne Bovina Brasileira. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>. Acesso em 15 jan. 2011.

AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v.115, p.243-249, 2009.

ALTIOK, D. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.21, p.2227-2236, 2010.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Maryland: AOAC, 2000.

APHA. American Public Health Association – **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª edição. Washington DC: APHA, 2001.

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

ASTM - American Society for Testing and Materials: **Standard method for water vapor transmission of materials**, Designation E96-95. In: Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: 1995.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**, Designation 882-91. In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1996.

BAIRD-PARKER, A.C. Acidos orgânicos. In: INTERNATIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICALSPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecologia microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia , p.132-142, 1980.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: A Review. **Food Science**, v.3, p.1-15, 2004

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, (Online) (2011).

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pig skin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1285-1289, 2007.

BRODY, A.L.; What's active in active packaging. **Food Technology**, v.55, p.104-106, 2001.

BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A.; PANIZZA, A.; CORBO, M. R.; NICOLAIS, L. A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable Wlms intended for food packaging applications. **Journal of Controlled Release**, v. 90, p. 97–107, 2003.

CAGRI, A.; OSBURN, W.; RYSER, E.T. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein based edible casings. **Journal Food Science**, v.66, p. 291-298, 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial edible films and coating. **Journal Food Protection**, v.67, p. 833-848, 2004.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. **Food Microbiology and Safety**, v.66, p.865-870, 2001.

CA'RDENAS, F. C.; GIANNUZZI, L; ZARITZKAY, N. E. Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. **Meat Science**, v.79, p.509–520, 2008.

CHANA-THAWORN, J.;CHANTHACHUM, S.; WITTAYA, T. Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. **Food Science and Technology**, v.44, p. 284–292, 2011.

CHEN, M.X.; YEH, G.H.C.;CHIANG, B.H.C. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal Food Processing and Preservation** v. 20, p.379-390, 1996.

CLSI - Clinical laboratory standards institute. 2003. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**, Document M2-A8. Approved Standard – Eight Edition. v. 23, n. 1, 2003.

EMBUSCADO, M.E.; HUBER, K.C.; **Edible film and coatings for food applications**. New York, Springer, 2009, 403p.

EMIROGLU, K.Z.; YEMIS, G.P.; COSKUN, B.K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v.86, p.283–288, 2010.

FALGUERA, V.;QUINTERO, J.P.;JIMÉNES, A.; MUÑOZ, J.A.; IBARZ, A.Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use.**Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.292-303, 2011.

FANG, Y.; TUNG, M. A.; BRITT, I. J.; YADA, S.; DALGLEISH, D. G. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v.67, p.188–193, 2002.

FLORES, S.; HAEDO, A. S.; CAMPOS, C.; GERSCHENSON, L.; Antimicrobial performance of sorbates supported in a tapioca starch edible film. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 375–384, 2007.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FRANSSEN, L. R.; KROCHTA, J. M. **Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods**. In S. Roller (Ed.), *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2003.

FREITAS I. R. **Otimização do processo de obtenção de isolados protéicos provenientes de pescado de baixo valor comercial**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

GARCIA, F.T.; SOBRAL, P.J.A. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. **Food Science and Technology**, v.38, p.289-296, 2005.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal Food Science Technology**, v. 29,p. 39–50, 1994.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: Mathlouthi M, editor. **Food packaging and preservation-theory and practice**. New York: Elsevier Applied Science Publisher. p. 371-394, 1986.

GUILLARD, V.; ISSOUPOV, V.; REDL, A.; GONTARD, N. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.108–115, 2009.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v.54, p.56-65, 2000.

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

HARRIS C. R.; THORARENSEN, A. Advances in the discovery of novel antibacterial agents during the year. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2213-43, 2004.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P.; Protein pf blend film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin and mungbean protein isolated. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p.663-673, 2011.

JAY, J.M.; **Microbiologia de alimentos.**, Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JIANG, Y. F.; LI, Y. X.; CHAI, Z.; LENG, X. J. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.58, p.5100-5108, 2010.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGANI, S. A. Past, current and potential utilization of active and passive packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v.74, p. 113–130, 2006.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.373–386, 2008.

LIMJAROEN, P.; RYSER, E., LOCKHART, H.; HARTE, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, v.19, p.95-109, 2003.

LIMPAN, N.; PRODPRAN T.; BENJAKUL S. & PRASARPAN S. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p.85-92., 2010.

MANAB, A.; SAWITRI, M. E.; AL AWWALY, K. U.; PURNOMO, H. Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. **African Journal of Food Science**, v. 5, p. 6-11, 2011.

MANAB, M.; SAWITRI, M.E., ZANAH, S.K. Effect of the addition of CaCl₂ as cross linked agent in whey protein edible film on its physical and chemical properties, **A Journal of Food Science**, v.3, p. 47-53, 2007.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H.S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. **Food Research International**, FRIN-03692, p.9, 2011.

MASSAGUER, P.R.; **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Varela, 2006.

MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Milk protein-based edible films and coatings. **Food Technolpgy**. v. 48, p.97-103, 1994.

MORAES, A.R.F.; GOUVEIA, L.E.R.; SOARES, N.F.F.; SANTOS, M.M.S.S.; GONÇALVES, M.P.J.C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 33-36, 2007.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food Bioprocess and Technology**, v.2, p.1-27, 2009.

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

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, v.86, p.215–224, 2008.

PARDI, M.C; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S **Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. Niterói: EDUFF, 2001, 623p.

PÉREZA, L.M.; BALAGUÉB, C.E.; RUBIOLOC, A.C.; VERDINIA, R.A. Evaluation of the biocide properties of whey-protein edible films with potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Procedia Food Science**, v.1, p.203-209, 2011.

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

RAMOS, O.L.; SILVA, S.I.; SOARES, J.C.; FERNANDES, J.C.; POÇAS, M.F.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, v.45, p.351–361, 2012.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v.81, p. 634–641, 2007.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 79-88, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N.F.A.; **Manual de Métodos de Análise Microbiológica**, São Paulo: Varela, 2001. 316p.

SILVEIRA, M.F.A. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. 2005. 64f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVEIRA, M.F.A.; SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R.M.; ANDRADE, N.J.; BOTREL, D.A.; GONÇALVES, M.P.J. Active Wlm incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. **Food Control**, v.18, p.1063–1067, 2007.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, JOHNSON, M.G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films, **Food Research International**, v.41, p.781–785, 2008.

SOARES, N.F.F.; RUTISHAUSER, D.; MELO, N.; CRUZ, R.S.; ANDRADE, N.J. Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**, v.15, p.129-132, 2002.

SOBRAL, P.J. A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1251-1259, 2000.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; HUBINGER, M.D.; ROQUES, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.423-432, 2001.

SOFOS, J.N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v.78, p.3-18, 2008.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, Campinas: UNICAMP, 2011.161p.

TASKAYA, L.; CHEN, Y. C.; JACZYNSKI, J. Functional properties of proteins recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. **Food Science and Technology**, v.42, p.1082–1089, 2009.

TONDO, E.C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**, Porto Alegre: Editora Sulina, 2011. 263 p.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, p.758-767, 2011.

YEANNES, M.I.; CASALES, M.R. Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoita (*Engraulis anchoita*). **Revista Alimentaria**, v.262, p. 87–91, 1995.

YEANNES, M.I.; CASALES, M.R. Modifications in the chemical compounds and sensorial attributes of *Engraulis anchoita* fillet during marinating process. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.798-803, 2008.

YOSHIDA, C.M.P.; ANTUNES, A.J. Aplicação de filmes protéicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.29, p.420-430, 2009.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p.335–342, 2011.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, v.70, p. 45-50, 2005.

ZINOVIADOU, K.G.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. **Food Hydrocolloids**, v.24, p.49–59, 2010.

ZINOVIADOU, K.G.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat**, v.10, p.234-245, 2009.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSÃO GERAL

A maior atividade antimicrobiana dos filmes à base de IPA incorporados com maiores concentrações de ácido sórbico (AS) e ácido benzóico (AB) foi demonstrada contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*.

O mesmo efeito inibitório foi observado quando os filmes incorporados com antimicrobianos foram aplicados em carne bovina contra *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, sendo que os filmes incorporados com AB, apresentaram maior inibição quando comparados aos filmes controle e contendo AS para os dois microrganismos testados.

CAPÍTULO V

5 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABIEC - Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne Produção e Exportação Mundial de Carne Bovina Brasileira. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>. Acesso em 15 jan. 2011.

AEWSIRI, T.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v.115, p.243-249, 2009.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.W.P. **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ALTIOK, D. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.21, p.2227-2236, 2010.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p. 1139-1145, 2006.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 17ª edição. Maryland: AOAC, 2000.

APHA. American Public Health Association – **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4ª edição. Washington DC: APHA, 2001.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H.; Review of Antimicrobial Food Packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 3, p. 113, 2003.

ARAÚJO, M.A.; **Química de alimentos**. Teoria e prática. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1995. 247p..

ASTM - American Society for Testing and Materials. **Standard test method for water vapor transmission of material**, Designation E96-95, In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: 1995.

ASTM - American Society for Testing and Materials> **Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting**, D882-91. In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: 1996.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.105-113. 2001.

AZEREDO, H. M. C.; MATTOSO, L. H. C.; AVEN-BUSTILLOS, R. J.; FILHO, G. C.; MUNFORD, M. L., WOOD, D.; MCHUGH, T. H. Nanocellulose Reinforced Chitosan Composite Films as Affected by Nanofiller Loading and Plasticizer Content. **Journal of Food Science**, v. 75, p. N1-N7, 2010.

BADOLATO, E.S.G; AUED-PIMENTEL,S.; TAVARES,M.; MORAIS,C. Sardinhas em óleo comestível. parte II. Estudo da interação entre os ácidos graxos do peixe e do óleo de cobertura. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, p.21-26, 1994.

BAIRD-PARKER, A.C.; Acidos orgânicos. In: International Commission on Microbiological Specifications for foods. **Ecologia microbiana de los alimentos** 1. Zaragoza: Acribia (Ed.), p.132-142, 1980.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: A Review. **Food Science**, v.3, p.1-15, 2004.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering** (Online), 2011.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A.; Effects of plasticizer on physical properties of pig skin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1285-1289, 2007.

BERTAN, L.C.; **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos à base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. 2003. 130f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal Chromatography**, v.336, p.93-104, 1984.

BODINI, R.B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos** São Paulo : Varela, 2003. 238p.

BODINI, R.B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

BOMONO R. A.; SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.49-56, 2006.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M.; FONTES, E. A. F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v.27, n.1, 2007.

BOURTOOM T. Review article: Protein edible film: Properties enhancement. **International Food Research**. v. 16, p. 1- 9, 2009.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Estatística da pesca e aqüicultura**, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999-2009**, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas Por Alimentos 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf. Acessado 03/2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Desembarques de Pescado no rio Grande do Sul**, 2009.

BRODY, A.L. What's active in active packaking. **Food Technology**, v.55, p.104-106, 2001.

BROUMAND, A.; EMAM-DJOMEH, Z.; HAMED, M.; RAZAVI, S.H. Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film. **Food Science and Technology**, v.44, p.2316-2323, 2011.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

BUONOCORE, G. G.; DEL NOBILE, M. A.; PANIZZA, A.; CORBO, M. R.; NICOLAIS, L. A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable Wlms intended for food packaging applications. **Journal of Controlled Release**, v. 90, p. 97–107, 2003.

CAGRI, A.; OSBURN, W.; RYSER, E.T. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein based edible casings. **Journal Food Science**, v.66, p. 291-298, 2003.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial edible films and coating. **Journal Food Protection**, v.67, p. 833-848, 2004.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E.T. Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. **Food Microbiology and Safety**, v.66, p.865-870, 2001.

CAMPOS, J.C.; FUJITA, E.; COSTA, S.M.; NEVES, L.C.; VIEITES, R.L.; CHAGAS, E.A. Irradiação e atmosfera modificada passiva na qualidade pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato'. **Revista Agro@ambiente On-line**, v.5, p. 233-239, 2011.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1153–1162, 2007.

CA'RDENAS, F. C.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKAY, N. E. Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. **Meat Science**, v. 79, p. 509–520, 2008.

CASTELLO, L.; CASTELLO, J. P. Anchovy stocks (*Engraulis anchoita*) and larval growth in the SW Atlantic. **Fisheries Research**, v. 59, p. 409-421, 2003.

CHA, D. S.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 223-237, 2004.

CHAMBI, H. N. M. **Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase**. 2004. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, , Campinas,

CHANA-THAWORN, J.; CHANTHACHUM, S.; WITTAYA, T. Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. **Food Science and Technology**, v.44, p. 284–292, 2011.

CHEFTEL, J-C.; CUQ, J-L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: Bioquímica – propiedades funcionales, Valor nutricional - modificaciones químicas**. Zaragoza: Acribia, 1989.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2563-2583, 1995.

CHEN, M.X.; YEH, G.H.C.; CHIANG, B.H.C. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. **Journal Food Process Preserve**, v. 20, p.379-390, 1996.

CHEN, Y.I.; JACZYUNSKI, J. Protein Recovery from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Processing by products via Isoelectric Solubilization/Precipitation and its Gelation Properties an Affected by Functional Additives. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 9079–9088, 2007.

CHO, S.Y.; RHEE, C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*-**Food Science and Technology**, v. 37, p. 833-839, 2004.

CHOI, W.S.; HAN, J.H. Film-forming mechanism and heat denaturation effects on the physical and chemical properties of pea protein-isolate edible films. **Journal of Food Science**, v.67, p.1399-1406, 2002.

CLSI- **Clinical laboratory standards institute**. Document M2-A8 - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard – Eight Edition. v. 23, n. 1, 2003.

CUQ, B., GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by moisture content. **Polymer**, v. 38, p.2399–2405, 1997.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 60, p.1369–1374, 1995.

DENAVI, G.A.; PÉREZ-MATEOSMM.; AÑÓN, M.C.; MONTERO, P.; MAURI, A.N.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.2094–2101, 2009.

EMBUSCADO, M.E.; HUBER, K.C. **Edible film and coatings for food applications**. New York: Springer, 2009. 403p.

EMIROGLU, K.Z.; YEMIS, G.P.; COSKUN, B.K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v.86, p.283–288, 2010.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L.C.B.; GONÇALVES, P.V.M.; MILANEZ, C.R.; STEEL, C.J.; COLLARES-QUEIROZ, F.P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, 2007.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J.P.; JIMÉNES, A.; MUÑOZ, J.A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.292-303, 2011.

FANG, Y.; TUNG, M. A.; BRITT, I. J.; YADA, S.; DALGLEISH, D. G. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v.67, p.188–193, 2002.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Fisheries and Aquaculture Department, Fact Sheets (2011). <http://www.fao.org/fishery/species/2916/en>. Acesso em janeiro de 2011.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERREIRA, A.H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste do pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e cera de carnaúba e de cana-de-açúcar**. 2006. 220p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FERREIRA, C.O., NUNES, C.A., DELGADILLO, I. & SILVA, J.A.L. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, p. 807–813, 2009.

FLORES, S.; HAEDO, A. S.; CAMPOS, C.; GERSCHENSON, L. Antimicrobial performance of sorbates supported in a tapioca starch edible film. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 375–384, 2007.

FLUHR, J. W.; DEGITZ, K. Antibiotics, azelaic acid and benzoyl peroxide in topical acne therapy. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 1, p.24-30, 2010.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FRANCO, B.D.G.M.F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.182p.

FRANCO, B.D.M.F.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; CHIARINI, E.; AZEVEDO, A.P.; LOPES, G.V.; FOGO, V.S. Perigos e riscos microbiológicos em carne bovina. In: **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, vol II, cap.65, p.1305-1320, 2010.

FRANSSEN, L. R.; KROCHTA, J. M. **Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods**. In S. Roller (Ed.), *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2003.

FREITAS I. R. **Otimização do processo de obtenção de isolados protéicos provenientes de pescado de baixo valor comercial**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GARCIA, E.E.C., PADULA, M., SARANTOPÓULOS, C.I.G.L. **Embalagens plásticas: propriedades de barreira**. Campinas: CETEA/ITAL, 1989. 44p.

GARCIA, F.T.; SOBRAL, P.J.A. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. **Food Science and Technology**, v.38, p.289-296, 2005.

GARCIA, L. V. **Avaliação das propriedades funcionais da anchoita (*Engraulis anchoita*) e das modificações produzidas durante o armazenamento em gelo e água do mar e processamento**. 2007. 135 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GARCÍA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coating. **Journal of Food Science**, v.65, n.6, p.941-947, 2000.

GEHRING, C.K.; GIGLIOTTI, J.C.; MORITZ, J.S.; TOU, J.C.; JACZYNSKI, J. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: A review. **Food Chemistry**, v.124, p.422-431, 2011.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S.; Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal Food Science Technology**, v. 29, p. 39–50, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim do SBCTA**, v.30, p.3-15, 1996.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 93, p. 511-520, 2005.

GOUNGA, M.E.; XU, S.Y.; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.521–530, 2007.

GROWER, J. L.; COOKSEY, K.; GETTY, K.L. Development and characterization of an antimicrobial packaging film coating containing nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.67, p.475-479, 2004.

GÜÇBILMEZ. Ç. M.; EMENICIOFLU, A.; ARSLANOFLU, A. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. **Food Research International**, v.40, p.80-91, 2007.

GUERRERO, P.; CABA, K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.261-269, 2010.

GUERRERO, P.; NUR HANANI, Z.A.; KERRY, J.P.; LA CABA, K. Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. **Journal of Food Engineering**, v. 107, p.41-49, 2011.

GUERRERO, P.; RETEGI, A.; GABILONDO, N.; CABA, K. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, v.100, p. 145-151, 2010.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: Mathlouthi M, editor. **Food packaging and preservation-theory and practice**. New York: Elsevier Applied Science Publisher. p. 371-394, 1986.

GUILLARD, V.; ISSOUPOV, V.; REDL, A.; GONTARD, N. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.108-115, 2009.

HAN JH, editor. **Innovations in food packaging**. San Diego.:Elsevier, 2005.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v.54, p.56-65, 2000.

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

HANSEN, J.E.; COUSSEAU, M.B.; GRU, D.L. Características poblacionales de la anchoita (*Engraulis anchoita*) del Mar Argentino. Parte I. El largo medio al primer año de vida, crecimiento y mortalidad. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, v. 4, p 21–48, 1984.

HARRIS C. R.; THORARENSEN, A. Advances in the discovery of novel antibacterial agents during the year. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2213-43, 2004.

HERRERA, J.; CORREO, C. Pré-estudo do desenvolvimento da indústria da anchoita. **Infopesca**, p.1-6, 1997.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Protein pf blend film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin and mungbean protein isolated. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p.663-673, 2011.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Journal of Food Engineering**, v.96, p. 66–73, 2010.

ISHIKAWA, N.; NAKAMURA, H.; FUJII, Y.; IWATA, K.; KIBASHI, K.; HASE, J. Studies on muscle alkaline protease-5. Effect of carp muscular alkaline protease upon Modori phenomenon in kamaboko production. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v.40, p.1051, 1974.

IWATA, K.; ISHIZAKI, S.; HANDA, A.; TANAKA, M. Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v.66, p.372-378, 2000.

JAFARPOUR, A.; GORCZYCA, E. M. Alternative techniques for producing a quality surimi and kamaboko from common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Food Science**, v.73, p.415–424, 2008.

JAY, J.M.; **Microbiología de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JIANG, Y. F.; LI, Y. X.; CHAI, Z.; LENG, X. J. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.58, p.5100-5108, 2010.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGANI, S. A. Past, current and potential utilization of active and passive packaging systems for meat and muscle-based products: A review. **Meat Science**, v.74, p. 113–130, 2006.

KINSELLA, J.E. Functional properties in foods: a survey. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 219-280, 1976.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. **Journal of Food Engineering**, v.105, p.295–305, 2011.

KRISTINSSON, H. G.; HULTIN, H.O. Effect of Low and High pH Treatment on the Functional Properties of Cod Muscle Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5103-5110, 2003.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, p. 43-81, 2000.

KRISTINSSON, H.G.; LIANG, Y. Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins, **Journal of Food Science**, v. 71, p. 304–312, 2006.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.373–386, 2008.

KROCHTA, J.M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: GENNADIOS, A. (Ed.). Protein-based films and coatings. Boca Raton: CRC Press, p.1-32, 2002.

LACONHA I.; BAGGAESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis phage type 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155-165, 2000.

LACROIX, M.; COOKSEY, K. Edible films and coatings from animal-origin proteins, 2005:

LEE, H.C.; HTOON, A.K.; UTHAYAKUMARAM, S.; PATERSON, J.L. Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger. **Food Chemistry**, v.102, p.1199–1207, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMJAROEN, P.; RYSER, E., LOCKHART, H.; HARTE, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, v.19, p.95-109, 2003.

LIMPAN, N., PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; PRASARPAN, S. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.85-92, 2010.

LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

LONGARES, A.; MONAHAN, F.J.; O'RIORDAN, E.D.; O'SULLIVAN, M. Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. **International Dairy Journal**, v.15, p.1255-1260, 2005.

MADUREIRA, L.S.P.; CASTELLO, J.P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; QUEIROZ, M.I.; SANTO, M.L.E.; RUIZ, W.A.; ABDALLAH, P.R.; HANSEN, J.; BERTOLOTTI, M.I., MANCA, E., YEANNES, M.I., AVDALOV, N.; FERNÁNDEZ AMORÍN, S.; Current and potential alternative food uses of the Argentine anchoita (*Engraulis anchoita*) in Argentina, Uruguay and Brazil. In M.R. Hasan and M. Halwart (eds). Fish as feed

inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications. **FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper**. n. 518. Rome, FAO. p. 269–287, 2009.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 137-156, 2010.

MANAB, A.; SAWITRI, M. E.; AL AWWALY, K. U.; PURNOMO, H. Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. **African Journal of Food Science**, v. 5, p. 6–11, 2011.

MANAB, M.; SAWITRI, M.E., ZANAH, S.K. Effect of the addition of CaCl_2 as cross linked agent in whey protein edible film on its physical and chemical properties, v.3, p. 47-53, 2007.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H.S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. **Food Research International**, FRIN-03692, p.9, 2011.

MARTINS, V.G.; **Obtenção de um hidrogel proveniente de proteínas da corvina (*Micropogonias furnieri*)**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Varela 2006.

MCHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Milk protein-based edible films and coatings. **Food Technolpgy**. v. 48, p.97-103, 1994.

MEINKE, W.W.; MATTIL; K.F. Autolysis as a factor in the production of protein isolates from whole fish, **Journal of Food Science**, v.38, p. 864–866, 1973.

MELO, N.R.; **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus sp.*** 2003. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MONTERREY-Q, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo de proteínas miofibrilares de Tilápia do Nilo para a elaboração de biofilmes. Solubilidade das proteínas em função do pH. **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro, RJ, p. 2086-2089, 15-17 de julho de 1998.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 179-189, 2000.

MONTERREY-QUINTERO, E.S. **Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes**. 1998. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassununga.

MORAES, A.R.F.; GOUVEIA, L.E.R.; SOARES, N.F.F.; SANTOS, M.M.S.S.; GONÇALVES, M.P.J.C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 33-36, 2007.

MORILLON, V.; DEBEAUFORT, F.; BLOND, G.; CAPELLE, M.; VOILLEY, A. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.2, p. 67-89, 2002.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymer**, v. 72, p. 82-87, 2008.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The Acid and Alkaline Solubilisation Process for the Isolation of Muscle Proteins: State of the Art. **Food Bioprocess Technology**, v.29, 2008.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I.; The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food Bioprocess and Technology**, v.12, p.1-27, 2009.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. **Manual de Pesca – Ciência de tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. 429p.

OJAGH, S.M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, p.161-166, 2010.

OKAMOTOM S.; Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**, v.23, p.257-262, 1978.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T. Differences among six Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v.45, p.61-69, 2001.

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

OLIVEIRA, L.M.; ALVES, R.M.V.; SARANTÓPULOS, C.I.G.L.; PADULA, M.; GARCIA, E.E.C.; COLTRO, L. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas: CETEA.. 1996. 219p.

ORDÓÑEZ, J. A.; **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005. 219p.

OU, S.; WANG, Y.; TANG, S.; HUANG, C.; JACKSON, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v.70, p. 205-210, 2005.

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

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, v.86, p.215–224, 2008.

PARDI, M.C; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. Rio de Janeiro: EDUFF, 2001, 623p.

PARK, J.W.; LANIER, T.C. Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and actin due to processing of muscle and protein purification. **Journal of Food Science**,v.54, n.1, p.49-51, 1989.

PASCHOALICK, T.M.; GARCIA, F.T.; SOBRAL, P.J. A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.419-427, 2003.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S.; **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill,1980.

PELISSARI, 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, 2009.

PÉREZ, L.M.; BALAGUÉ, C.E.; RUBIOLÓ, A.C.; VERDÍNIA, R.A. Evaluation of the biocide properties of whey-protein edible films with potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli*. **Procedia Food Science**, v.1, p.203 – 209, 2011.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. **Journal of Food Science**, v. 64, p. 695-698, 2001.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Denaturation time and temperature effect on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, v.66, p.705-710, 2001.

PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, v.45, p.351–361, 2012.

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

RAMOS, O.L.; SILVA, S.I.; SOARES, J.C.; FERNANDES, J.C.; POÇAS, M.F.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, v.45, p.351–361, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692p.

RANTSIOU, K.; MATARAGAS, M.; JESPERSEN, L.; COCOLIN, L. Understanding the behavior of foodborne pathogens in the food chain: New information for risk assessment analysis. **Trends in food & Science Technology**, p.1-9, 2011.

RIBEIRO, M.G.; PINTO, J.P.A.; SILVA, E.O.T.R. De hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica. **Higiene alimentar**, v.13, p.66-67, 1999.

RIVAS, M.; SOSA-ESTANI, S.; RANGEL, J.; CALETTI, M.G.; VALLÉS, P.; ROLDAN, C.D.; BALBI, L.; MARSANO DE MOLLAR, M.M.; AMOEDO, D.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; HOEKSTRA, R.M.; MEAD, P.; GRIFFIN, P.M. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.763, 2008.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R. MARTÍN-BELLOSO, O.; Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **Journal of Food Engineering**, v.81, p. 634–641, 2007.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: ITAL/CETEA, 2002. 267 p.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; ALVES, R.V.; OLIVEIRA, L.M.; GOMES, T.C. **Embalagens com atmosfera modificada**. Campinas: CETEA/ITAL, p. 99-114, 1996.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. J. Properties of soluble powders from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 520-529, 2006.

SATHIVEL, S.; Functional and nutritional-enhancing protein isolates from Arrowtooth Flounder. **Annual Meeting – Chicago**. University of Alaska. Chicago, 2003.

SCHWINGEL, P.R. **Alimentação de *Engraulis anchoita* (Clupeiforme, Engraulidae) na plataforma continental do Rio Grande do Sul**. 1991. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

SCHWINGEL, P.R.; CASTELLO, J.P. **Programa para Desenvolvimento de Pesca da Anchoita (*Engraulis anchoita*) no sul do Brasil**. Convênio MA-UNIVALI. Relatório Final, 2000.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996.517p.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, p. 79-88, 2007.

SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A.; PAN, B. S. **Composicion nutritive de los principales grupos de animales marinos utilizados como alimento**. In: SIKORSKI, Z. E. Tecnologia de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación. Zaragoza: Acribia, p. 52-59, 1994.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N.F.A.; **Manual de Métodos de Análise Microbiológica**, São Paulo: Varela, 2001. 316p.

SILVEIRA, M.F.A. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. 2005. 65f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVEIRA, M.F.A.; SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R.M.; ANDRADE, N.J.; BOTREL, D.A.; GONÇALVES, M.P.J. Active Wlm incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. **Food Control**, v.18, p.1063–1067, 2007.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, JOHNSON, M.G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films, **Food Research International**, v.41, p.781–785, 2008.

SOARES, N.F.F.; RUTISHAUSER, D.; MELO, N.; CRUZ, R.S.; ANDRADE, N.J. Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**, v.15, p.129-132, 2002.

SOBRAL, P. J. A, MONTERREY-QUINTERO, E. S., HABITANTE, A. M. Q. B. Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. **Journal of Thermal Analalysis and Calorimetry**, v.67, p.499–504, 2002.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteína miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1251-1259, 2000.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; HUBINGER, M.D.; ROQUES, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.423-432, 2001.

SOFOS, J.N. Challeges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v.78, p.3-18, 2008.

SOUZA, S.M.A.; **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares bovina**. 2001. 207f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. **Journal of Food Science**, v. 59, p.1332-1337, 1994.

SWAIN, S. N.; BISWAL, S. M.; NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable soy-based plastics: Opportunities and challenges. **Journal of Polymer Environment**, v.12, p.35-42, 2004.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, Campinas:UNICAMP. 2011.161p.

TANAKA, M., IWATA, K., SANGUANDEEKUL, R. Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v.67, 346-351, 2001.

TASKAYA, L.; CHEN, Y. C.; JACZYNSKI, J. Functional properties of proteins recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. **Food Science and Technology**, v.42, p.1082-1089, 2009.

TÉO, C. R.P.A., **Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no paran entre janeiro de 1999 e junho de 2001**. 2002. 101f. Dissertao (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, v. 103, p.1-10, 2007.

THORARINSDOTTIR, K.A.; ARASON, S.; GEIRSDOTTIR, M.; BOGASON, S.G.; KRISTBR GSSO; Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, p.377-385, 2002.

TONDO, E.C.; BARTZ, S.; **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de Alimentos**, Porto Alegre: Editora Sulina, 2011. 263 p.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, p.758-767, 2011.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 175-182, 2004.

TURBIANI, F.R.B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sodio reticulados com benzoato de calcio**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TURE, H.; GALLSTEDT, M.; HEDENQVIST, M.K. Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. **Food Research International**, v.45, p.109–115, 2012.

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

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 62p. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo.

VIEIRA, M.G.A.; SILVA, M.A.; SANTOS, L.O.; BEPPU, M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v.47, p.254–263, 2011.

WANG, S.; DUAN, H.; ZHANG, W.; LI, J.W. Analysis of bacterial foodborne disease outbreaks in China between 1994 and 2005. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p.8-13, 2007.

WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 411-417, 1999.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with Listeria? **Food Science and Technology**, v.20, p.245-254, 2009.

YEANNES, M.I.; CASALES, M.R. Estudio de las variables de proceso de marinados de anchoita (*Engraulis anchoita*). **Revista Alimentaria**, v.262, p. 87–91, 1995.

YIN, S.; CHEN, J.; SUN, S.; TANG, C.; YANG, X.; QI, J. Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (*Sapindus mukorossi* Gaertn.). **Food Chemistry**, v.128, p.420–426, 2011.

YONGSAWATDIGUL, J.; PARK, J.W. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. **Food Chemistry**, v.83, p.409-416, 2003.

YOSHIDA, C.M.P.; ANTUNES, A.J.; Aplicação de filmes protéicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.29, 2009.

ZERO HORA. **Pesquisadores estudam utilização da anchoíta na merenda escolar**. Jornal Zero Hora, 11 de novembro de 2011. Disponível em <http://wp.clicrbs.com.br>. Acessado em dezembro de 2011.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p.335–342, 2011.

ZINOVIADOU, K.G.;KOUTSOUMANIS, K.P.;BILIADERIS, C.G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. **Food Hydrocolloids**, v.24, p.49–59, 2010.

ZINOVIADOU, K.G.;KOUTSOUMANIS, K.P.;BILIADERIS, C.G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat**, v.10, p.234-245, 2009.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, v.70, p. 45–50, 2005.

APÊNDICES

Apêndice 1

Efeitos estimados para a resposta solubilidade – S (%)

Variáveis	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
Média/interação	37,29	0,35	104,30	0,000092
(1)Proteína (L)	4,08	0,83	4,86	0,039743
(2)Plastificante (L)	9,21	0,83	10,98	0,008189
(3)Temperatura (L)	9,88	0,83	11,77	0,007134
1L com 2L	1,35	0,83	1,61	0,247508
1L com 3L	-0,18	0,83	-0,21	0,849939
2Lcom 3L	-0,505	0,83	-0,65	0,5079273

Apêndice 2

Coeficientes de regressão para a solubilidade – S (%)

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	Valor p
Média/interação	37,30	0,35	104,30	0,000092
(1)Proteína (L)	2,04	0,42	4,86	0,039743
(2)Plastificante (L)	4,60	0,42	10,98	0,008189
(3)Temperatura (L)	4,93	0,42	11,77	0,007134

Apêndice 3

Análise de variância (ANOVA) para a resposta solubilidade – S (%)

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau liberdade	Média quadrática	Teste F	F_{tab} (95%)	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	400,78	3	133,60	23,64	4,12	5,74
Resíduo	39,53	7	5,65			
Falta de ajuste	39,53	5				
Erro puro	2,81	2				
Total	440,31	10				

Apêndice 4

Efeitos estimados para a resposta resistência a tração – RT (MPa)

Variáveis	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
Média/interação	1,68	0,01	123,90	0,000065
(1)Proteína (L)	-0,44	0,03	-13,88	0,005152
(2)Plastificante (L)	-1,45	0,03	-45,55	0,000482
(3)Temperatura (L)	-1,40	0,03	-43,83	0,000520
1L com 2L	0,12	0,03	3,68	0,066389
1L com 3L	0,37	0,03	11,68	0,007247
2Lcom 3L	0,500	0,03	15,76	0,004002

Apêndice 5

Coeficientes de regressão para a resposta resistência a tração – RT (MPa)

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	Valor p
Média/interação	1,68	0,01	123,90	0,000065
(1)Proteína (L)	-0,22	0,01	-13,88	0,005152
(2)Plastificante (L)	-0,73	0,01	-45,55	0,000482
(3)Temperatura(L)	-0,70	0,01	-43,83	0,000520
1L com 3L	0,19	0,01	11,68	0,007247
2L com 3L	0,25	0,01	15,76	0,004002

Apêndice 6

Análise de variância (ANOVA) para a resposta resistência a tração – RT (MPa)

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau liberdade	Média quadrática	Teste F	F_{tab} (95%)	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	9,31	5	1,86	93,0	5,05	18,42
Resíduo	0,13	5	0,02			
Falta de ajuste	0,13	3				
Erro puro	0,00	2				
Total	9,44	10				

Apêndice 7

Efeitos estimados para a resposta alongação – E (%)

Variáveis	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
Média/interação	21,90	0,14	153,66	0,000042
(1)Proteína (L)	7,91	0,33	23,68	0,001779
(2)Plastificante (L)	12,66	0,33	37,89	0,000696
(3)Temperatura (L)	6,66	0,33	19,94	0,002506
1L com 2L	2,03	0,33	6,10	0,025860
1L com 3L	-1,46	0,33	-4,38	0,048445
2Lcom 3L	1,59	0,33	4,75	0,041566

Apêndice 8

Coeficientes de regressão para a resposta alongação – E (%)

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	Valor p
Média/interação	21,89	0,14	153,66	0,000042
(1)Proteína (L)	3,96	0,17	23,68	0,001779
(2)Plastificante (L)	6,33	0,17	37,89	0,000696
(3)Temperatura (L)	3,33	0,17	19,93	0,002502
1L com 2L	1,01	0,17	6,10	0,025860
1L com 3L	-0,73	0,17	-4,38	0,048445
2L com 3L	0,80	0,17	4,75	0,041566

Apêndice 9

Análise de variância (ANOVA) para a resposta alongação – E (%)

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau liberdade	Média quadrática	Teste F	F_{tab} (95%)	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	552,74	6	92,12	15,60	6,16	2,53
Resíduo	23,64	4	5,91			
Falta de ajuste	23,64	2				
Erro puro	0,44	2				
Total	576,38	10				

Apêndice 10

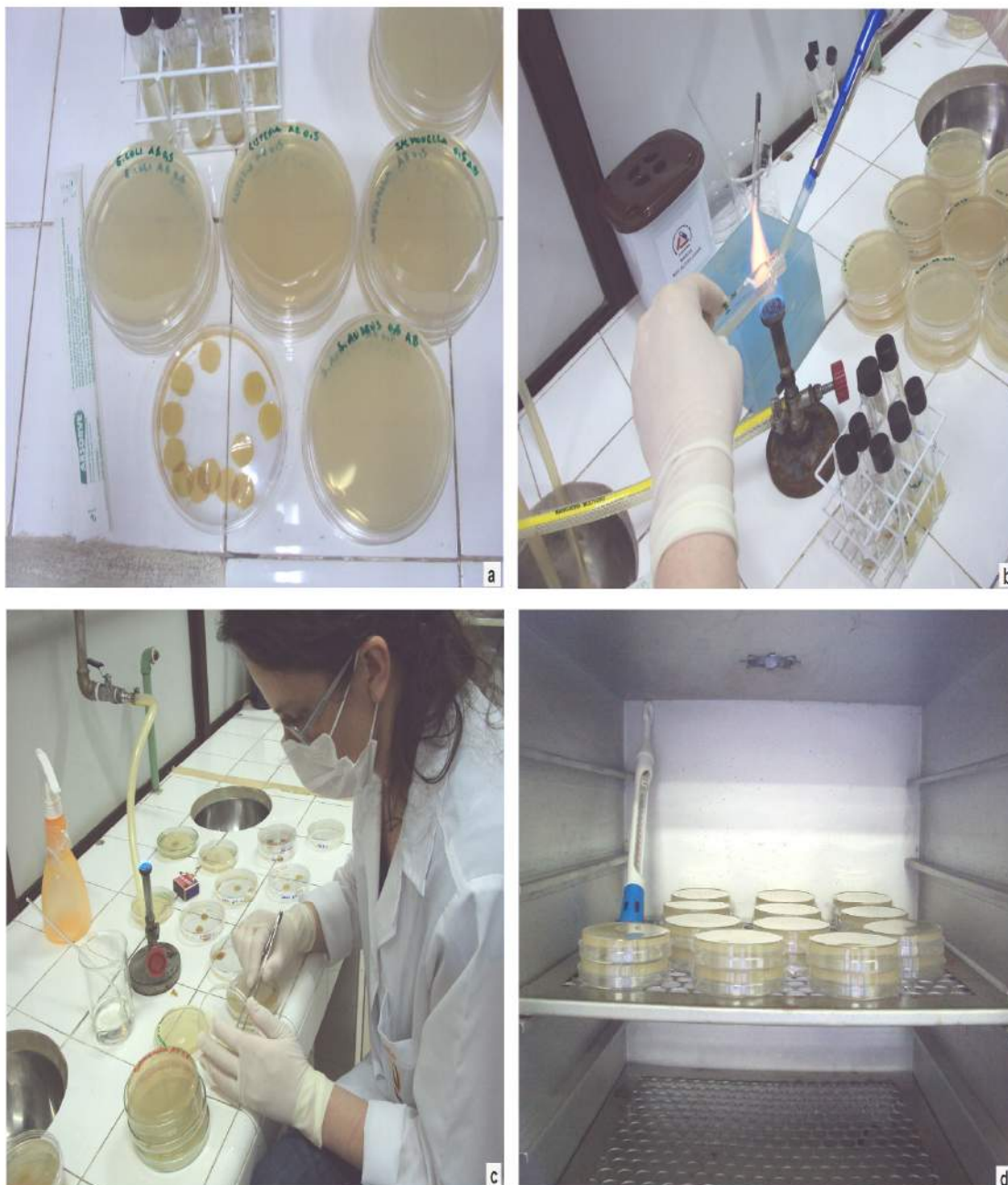
Teste de difusão em discos



(a) Filmes expostos à luz UV; (b) corte asséptico dos filmes; (c) inóculos dos diferentes microrganismos; (d) padrão 0,5 Mc Farland e (e) placas preparadas para serem inoculadas.

Apêndice 11

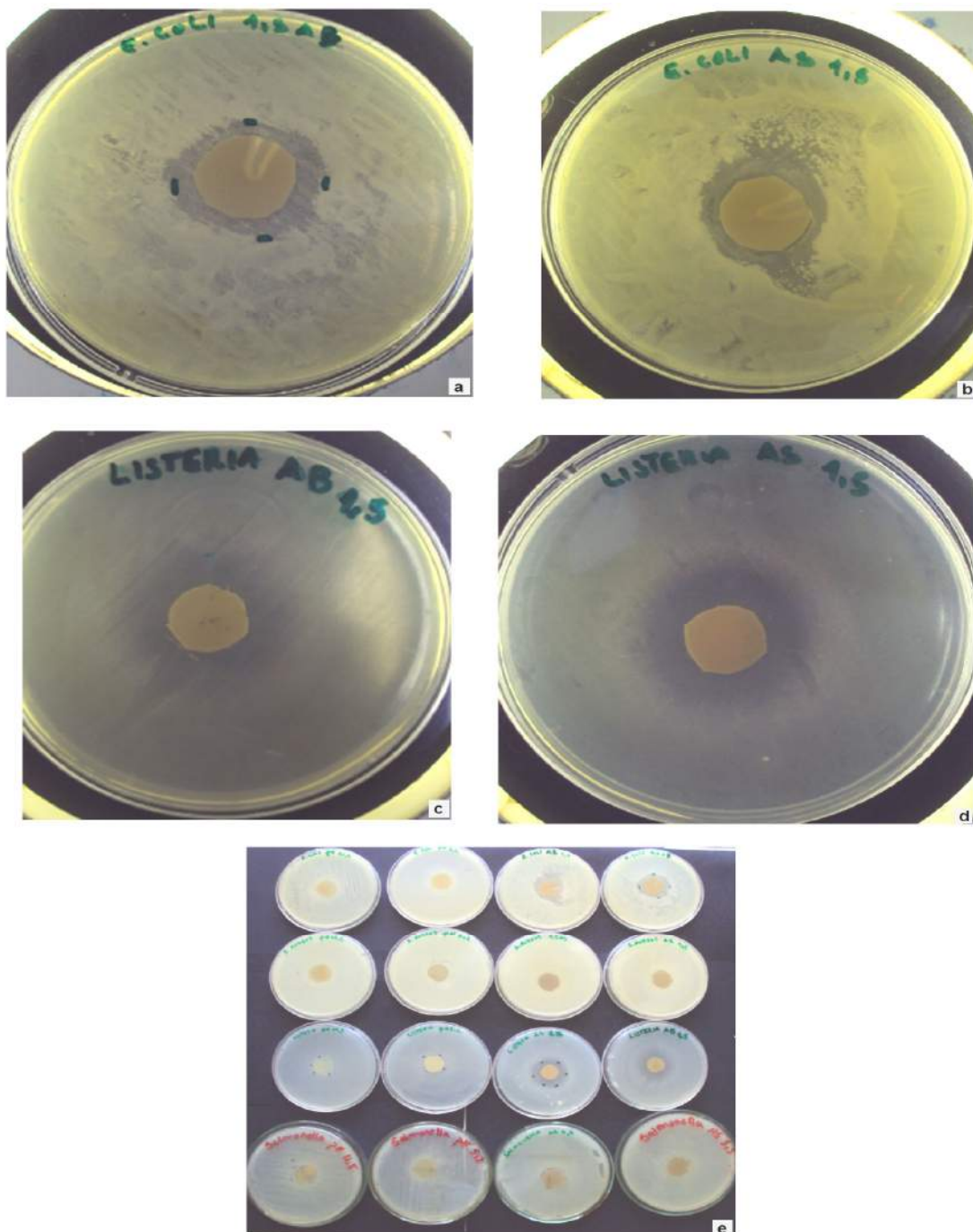
Aplicação dos discos de filmes incorporados com agentes antimicrobianos



(a) Discos dos filmes incorporados com agentes antimicrobianos, suabe e placas com ágar MH; (b) alíquota retirada do inóculo; (c) aplicação dos discos dos filmes incorporados com antimicrobianos nas placas inoculadas com os diferentes microrganismos e (d) placas incubadas invertidas.

Apêndice 12

Halo total de inibição

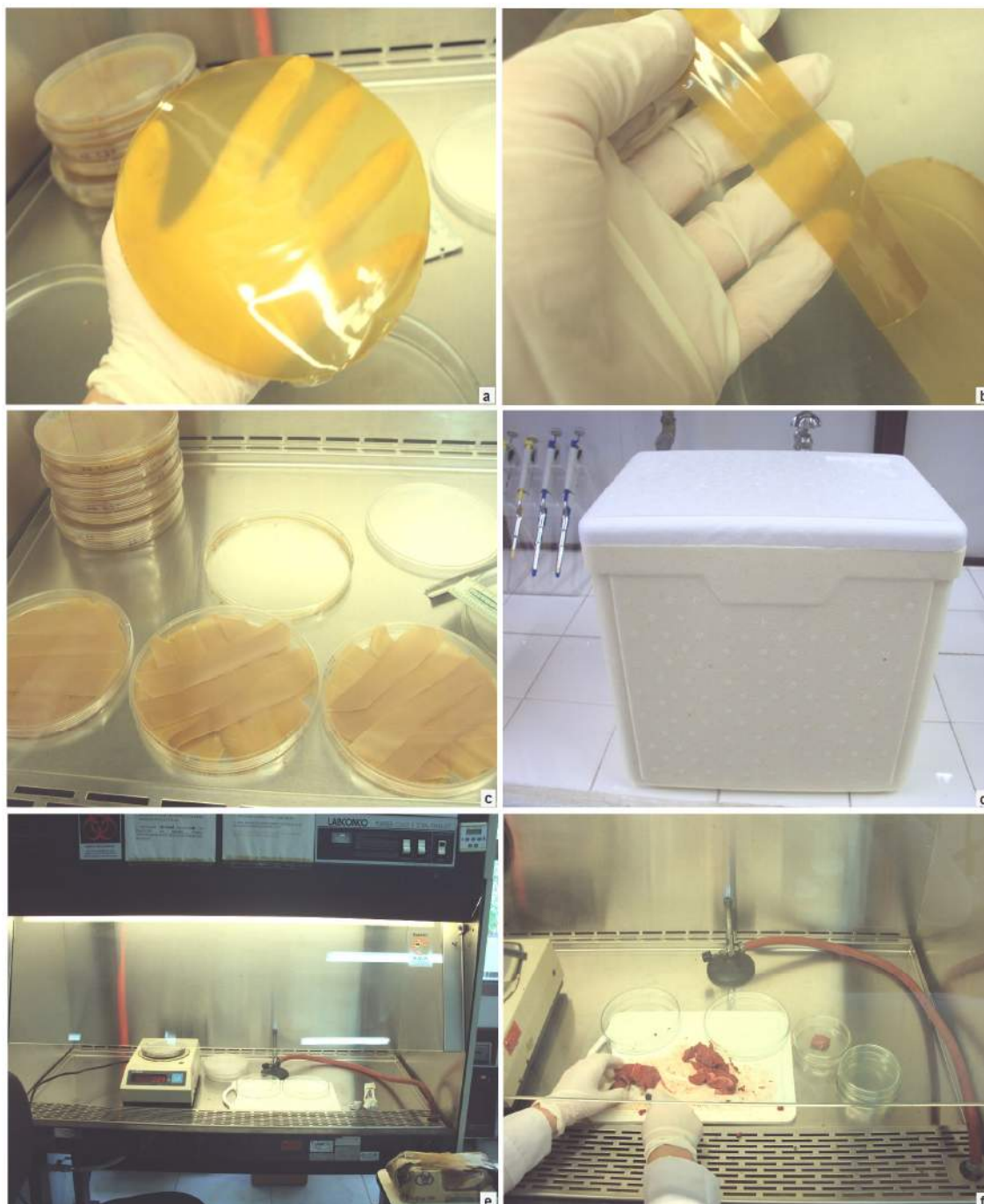


- (a) Halo total de inibição da *E. coli* O157:H7 pelo filme incorporado com 1,50% de AB;
 (b) Halo total de inibição da *E. coli* O157:H7 pelo filme incorporado com 1,50% de AS;
 (c) Halo total de inibição da *L. monocytogenes* pelo filme incorporado com 1,50% de AB;
 (d) Halo total de inibição da *L. monocytogenes* pelo filme incorporado com 1,50% de AS e
 (e) Halo total de inibição de filmes controle (pH 5,2 e 11,5) e 1,50% de AS e

AB.

Apêndice 13

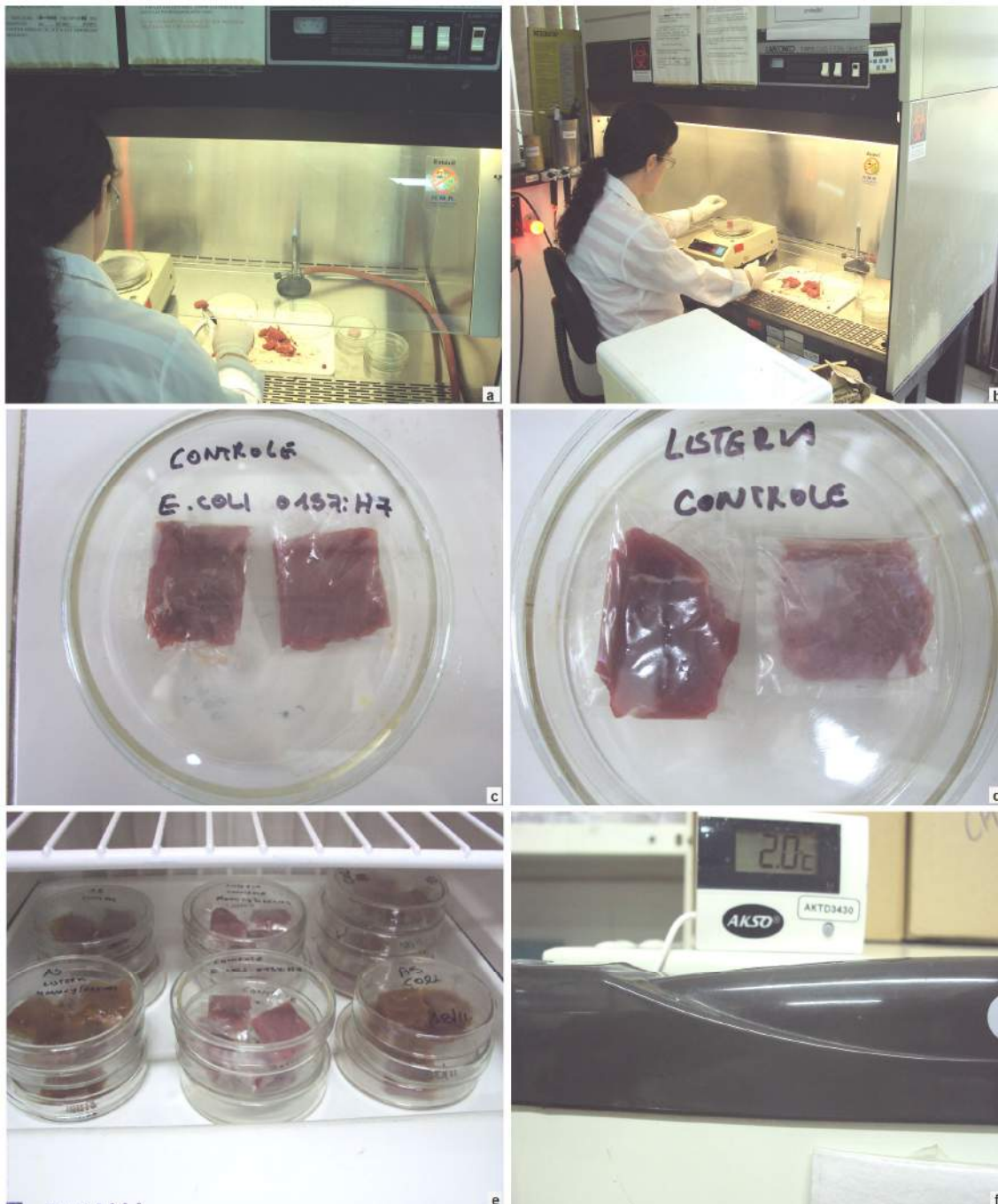
Aplicação dos filmes incorporados com AS ou AB como embalagem em carne bovina



(a) Filmes incorporados com agente antimicrobiano; (b) corte em tiras dos filmes antimicrobianos; (c) tiras dos filmes antimicrobianos; (d) caixa de acondicionamento da carne bovina para transporte; (e) placa de polietileno e balança para corte e pesagem da amostra de carne bovina.

Apêndice 14

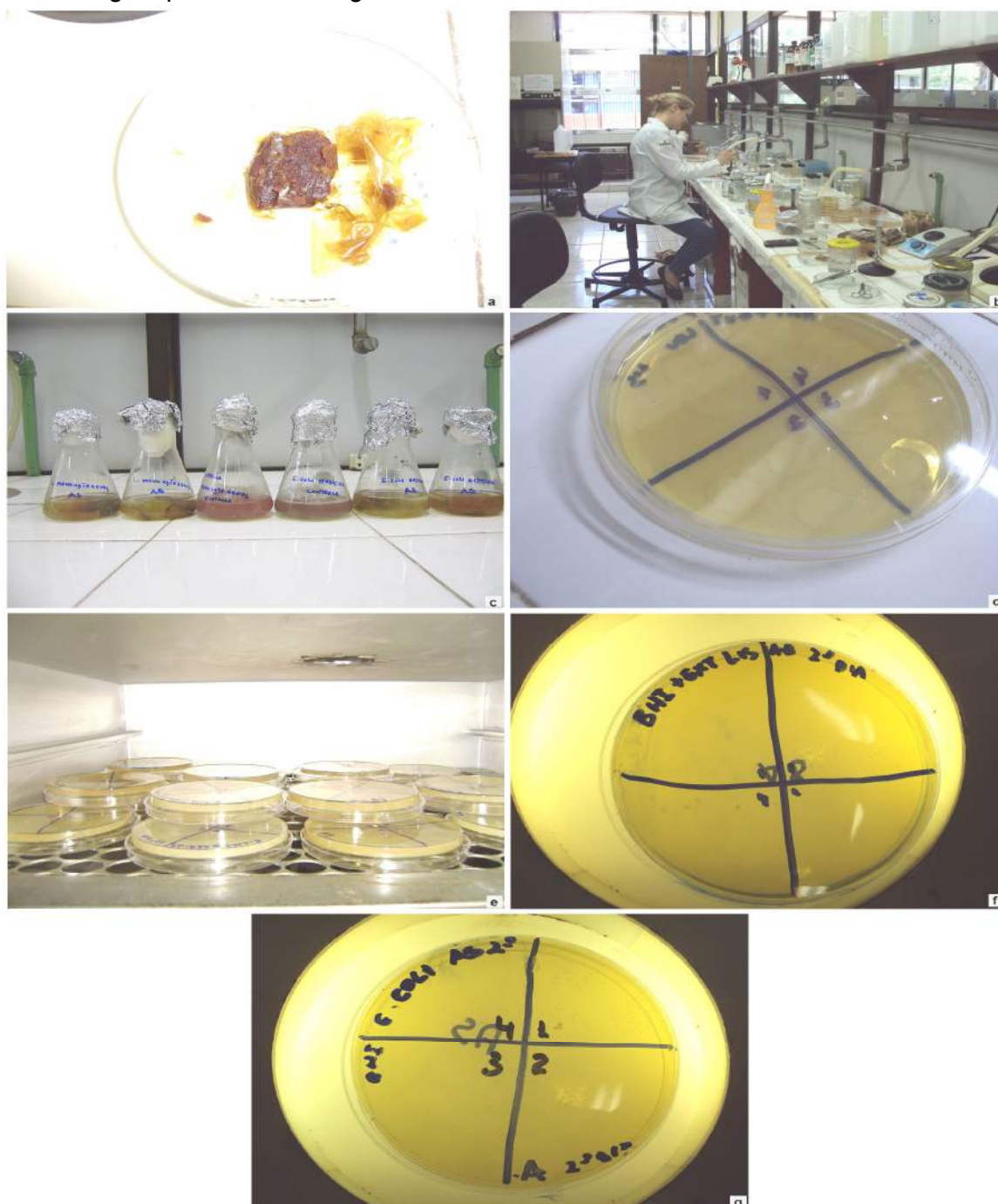
Carne embaladas com os diferentes tratamentos



(a) corte da carne bovina; (b) pesagem da amostra de carne bovina; (c) amostra de carne inoculada com *E. coli* O157:H7 embalada com o filme controle; (d) amostra de carne inoculada com *L. monocytogenes* embalada com o filme controle; (e) armazenamento das amostras embaladas com filmes com e sem incorporação de agentes antimicrobianos; (f) temperatura de armazenamento.

Apêndice 15

Contagem pelo método de gotas



- (a) Retirada do filme da amostra de carne bovina; (b) desenvolvimento do trabalho; (c) amostras em água peptonada estéril; (d) inoculação das placas pelo método de plaqueamento em gotas; (e) placas incubadas invertidas; (f) contagem no 2º dia de armazenamento da *L. monocytogenes*; (g) contagem no 2º dia de armazenamento da *E. coli* O157:H7.