



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS ANTIMICROBIANOS
COM ISOLADO PROTÉICO DE FRANGO E NANOARGILAS

Bruna da Silva Menezes

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández
ORIENTADOR

Rio Grande, RS

2014

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS ANTIMICROBIANOS
COM ISOLADO PROTÉICO DE FRANGO E NANOARGILAS

Bruna da Silva Menezes

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández
ORIENTADOR

Rio Grande, RS

2014

M543o	<p>Menezes, Bruna da Silva Obtenção e avaliação de filmes nanocompósitos antimicrobianos com isolado protéico de frango e nanoargilas / Bruna da Silva Menezes. – 2014.</p> <p>82 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.</p> <p>Orientador: Dr. Carlos Prentice-Hernández</p> <p>1. Engenharia e Ciência de alimentos. 2. Isolado proteico. 3. Frango. 4. Filmes. 5. Antimicrobianos. 6. Montmorilonita. 7. Óleo essencial de orégano. I. Prentice-Hernández, Carlos. II. Título.</p> <p>CDU 664</p>
-------	---

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus que durante toda minha vida me acompanha e me mantém com fé e coragem para seguir em frente.

A minha mãe e meu pai, Rozimeri e Danilo e ao meu irmão Bernardo, pelo amor, educação, compreensão, apoio, incentivo, confiança em todos os momentos da minha vida. Obrigada por estarem ao meu lado em todas as horas e pelas palavras de incentivo nos momentos incertos e certos.

Ao Allan pela compreensão, amizade, companheirismo, paciência e amor dedicado em todos os momentos dessa caminhada. Obrigado por tudo, obrigada por me compreender e ajudar a superar minhas dificuldades, você é meu porto seguro.

Aos meus familiares, meus tios(as), primos(as), dindo(a), avós e avô que estão sempre comigo me incentivando e acreditando no meu potencial, são a estrutura essencial para minha vida ter sentido .

As minhas amigas e amigos por todo apoio e amizade, longe ou perto estão sempre presentes na minha caminhada. Agradeço também pelos momentos de diversão compartilhados.

Ao Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández pela orientação, amizade, confiança, apoio e conhecimento proporcionado para a realização deste trabalho.

Ao William Renzo Cortez Vega pela amizade, apoio, conhecimento compartilhado no decorrer do trabalho.

À pós doutoranda, Michele Moraes por todo conhecimento, disponibilidade, amizade e incentivo.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela amizade e apoio, pois sem esse convívio agradável diário com certeza a caminhada não teria sido a mesma.

A Sabine, obrigada pela amizade, paciência e disposição, és responsável para o bom andamento deste trabalho também.

Aos estagiários Bernardo, Juliana, Daniela e Lauren pela colaboração nos experimentos realizados, contribuição e pela ótima companhia.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade do Rio Grande, pelos conhecimentos proporcionados e pela amizade. Em especial as professoras Myriam de las Mercedes Salas Mellado e Vilásia Guimarães Martins, por fazerem parte da banca de qualificação e contribuírem com a versão final deste trabalho.

À secretária da pós-graduação Islanda, pelo serviço prestado sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Eduardo César Tondo e toda sua equipe, pela acolhida no Laboratório de Microbiologia e Controle dos Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e disponibilidade de seu laboratório para análise microbiológica deste trabalho.

À companhia Minuano Alimentos S.A. pelo fornecimento da matéria-prima.

Enfim, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a vencer mais uma etapa.

RESUMO

Polissacarídeos, proteínas, lipídios são considerados os biopolímeros mais promissores para produção de filmes devido sua biodegradabilidade, sustentabilidade e abundância. As proteínas se destacam dos demais, pois possuem uma estrutura com 20 monômeros diferentes, que confere um amplo potencial de ligações intermoleculares. Filme com adição de antimicrobianos tem a possibilidade proteger alimentos contra a deterioração e diminuição de crescimento de patógenos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar as propriedades e a atividade antimicrobiana de filmes à base de isolado protéico de frango (IPF) com adição de montmorilonita (MMT), e a avaliação antimicrobiana em filmes com adição de óleo essencial de orégano. Para tanto, foi elaborado o IPF, pela solubilização alcalina da proteína e precipitação no ponto isoelétrico a partir de carne mecanicamente separada de frango. A solução formadora dos filmes foi elaborada a partir de IPF, água, glicerol e hidróxido de sódio. As formulações dos filmes foram elaboradas conforme a técnica de *casting*, segundo um planejamento fatorial 2^3 . Foram avaliadas as propriedades de resistência a tração (RT) e alongação (E); espessura, solubilidade; permeabilidade ao vapor de água (PVA); opacidade; microscopia eletrônica de varredura (MEV); difração de raio-X (DRX); espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). Os filmes com diferentes concentrações de montmorilonita foram desenvolvidos e suas propriedades foram comparadas aos filmes controles. Estes filmes e filmes com adição de óleo essencial de orégano foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* pelo método de difusão em disco. Os filmes com maior atividade antimicrobiana e os filmes controle foram aplicados sobre miúdos de frango (fígado), e foram avaliados os micro-organismos psicotróficos pelo método de contagem. A alongação e PVA dos filmes não foram afetados pelas variáveis estudadas no experimento. A menor solubilidade e opacidade e maior RT dos filmes ocorreram em alta concentração de MMT ($0,8\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$), baixa de glicerol ($0,2\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$), intermediária de IPF ($2,0\text{g}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) e tratamento térmico a $70\text{ }^\circ\text{C}$. A maior atividade antimicrobiana foi verificada nos filmes com 1,2% de óleo essencial de orégano frente a *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, que apresentou efeito antimicrobiano quando aplicado em fígado de frango com uma redução de $1,5\text{ Log}\cdot\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ em relação ao filme controle. Os filmes adicionados de óleo essencial de orégano podem ser eficazes contra os patógenos alimentares testados e a MMT é capaz de gerar propriedades estruturais melhoradas em filmes a base de IPF.

Palavras chaves: isolado protéico; frango; filmes; antimicrobianos; montmorilonita; óleo essencial de orégano.

ABSTRACT

Polysaccharides, proteins and lipids are considered the most promising biopolymers for film production because of their biodegradability, sustainability and abundance. Proteins stand out from the others because they have a structure with 20 different monomers, which confers broad potential of intermolecular bonds. A film with added antimicrobials has the ability to protect food against deterioration and reduction of the growth of pathogens. The aim of this study was to develop and evaluate the properties and the antimicrobial activity of the films based on the chicken protein isolate (CPI) with the addition of montmorillonite (MMT), and antimicrobial evaluation in films with the addition of oregano essential oil. Thus, the CPI was prepared by alkaline solubilization of protein and precipitation at the isoelectric point from mechanically separated meat of chicken. The film forming solution was prepared from CPI, water, glycerol and sodium hydroxide. The compositions of the films were prepared according to the casting technique, following a 2³ factorial design. The properties evaluated were: tensile strength (TS) and elongation (E), thickness, solubility, water vapor permeability (WVP), opacity, scanning electron microscopy (SEM), X-Ray Diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The films with different concentrations of montmorillonite were developed and their properties were compared to the control films. These films and the films with the addition of oregano essential oil were evaluated for their antimicrobial activity against microorganisms *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by the disk diffusion method. The films with higher antimicrobial activity and control films were applied on chicken giblets (liver), and psychotropic microorganisms were evaluated by the counting method. The elongation and WVP of the films were not affected by the variables in the experiment. The lower solubility and opacity and higher TS of the films occurred in high concentration of MMT (0,8g.100 mL⁻¹), low glycerol (0,2g.100 mL⁻¹), of intermediate CPI (2,0g.100 mL⁻¹) and heat treatment at 70 °C. The highest antimicrobial activity was observed in the films with 1.2% oregano essential oil against *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*, which showed antimicrobial effect when applied to chicken liver with a decrease of 1.5 Log.CFU.g⁻¹ compared to the control film. The films added with essential oregano oil can be effective against the tested food pathogens and the MMT is able to generate improved structural properties in films based in CPI.

Keywords: protein isolate; chicken; films; antimicrobials; montmorillonite; oregano essential oil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis utilizadas no planejamento experimental para desenvolvimento dos filmes nanocompósitos de isolado protéico de frango e nanoargilas.	29
Tabela 2 - Composição proximal de carne mecanicamente separada de frango em base seca	38
Tabela 3 - Composição proximal da carne mecanicamente separada de frango e do isolado proteico de frango.	39
Tabela 4 - Resistência à tração, alongação e solubilidade de filmes de isolado protéico de frango obtidas em diferentes temperaturas	43
Tabela 5 - Cor e opacidade de filmes de isolado protéico de frango obtidos em diferentes temperaturas.....	44
Tabela 6 - Determinação da espessura dos filmes de isolado de frango e nanoargilas	45
Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental utilizado para avaliação das propriedades mecânicas de filmes de isolado protéico de frango e nanoargilas	46
Tabela 8 - Coeficiente de regressão para a variável resistência a tração de filmes de isolado proteico de frango e nanoargilas.....	47
Tabela 9 - Verificação da validade estatística do modelo para resistência a tração	48
Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental utilizado para avaliação da opacidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água de filmes de isolado protéico de frango e nanoargilas.....	49
Tabela 11 - Coeficiente de regressão para a variável opacidade de filmes de isolado protéico de frango e nanoargilas.....	50
Tabela 12 - Verificação da validade estatística do modelo para opacidade	51
Tabela 13 - Coeficiente de regressão para a variável solubilidade de filmes de isolado proteico de frango e nanoargilas.....	52
Tabela 14 - Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade.....	52
Tabela 15 – Firmeza (N) para carne de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 °C durante 12 dias.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma do processo de obtenção de isolado protéico de frango	27
Figura 2 - Fluxograma do processo de obtenção de filme nanocompósito de isolado protéico de frango e nanoargilas.....	30
Figura 3 - Curva de solubilidade de isolado protéico de frango em pH ácido e alcalino.....	40
Figura 4 - Capacidade de retenção de água de isolado protéico de frango.	41
Figura 5 - Eletroforetograma da amostra de isolado protéico de frango.	42
Figura 6 - Superfície de resposta da resistência a tração em função da concentração de (a) isolado protéico e MMT (b) isolado protéico e Glicerol	48
Figura 7 - Superfície de resposta da opacidade em função da concentração de (a) isolado protéico e MMT (b) isolado protéico e Glicerol.....	51
Figura 8 - Superfície de resposta da solubilidade em função da concentração de (a) isolado protéico e MMT (b) isolado protéico e Glicerol.....	53
Figura 9 – Espectroscopia no infravermelho de filmes de isolado protéico de frango sem montmorilonita.	54
Figura 10 - Espectroscopia no infravermelho de filmes de isolado protéico de frango com montmorilonita.	54
Figura 11 - MEV de filmes de isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango (a) sem adição de montmorilonita (b) com adição de montmorilonita	56
Figura 12 - MEV da montmorilonita natural (MMT-Na), com aumento de 2000x.	56
Figura 13 - MEV de filmes de isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango com adição de montmorilonita com aumento de 3000x.....	56
Figura 14 - DRX de filmes de isolado protéico de CMSF sem montmorilonita (branco) e com montmorilonita (filme ativo).	57
Figura 15 - DSC de filmes de isolado protéico de frango sem montmorilonita.....	58
Figura 16 - DSC de filmes de isolado protéico de frango com montmorilonita	59
Figura 17 - Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de frango com e sem incorporação de agentes antimicrobianos frente a <i>Listeria monocytogenes</i> J11.....	60
Figura 18 - Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de frango com e sem incorporação de agentes antimicrobianos frente a <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	61
Figura 19 - Efeito do óleo essencial de orégano e IPF na luminosidade (L*) de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 oC durante 12 dias.	63

Figura 20 - Efeito do óleo essencial de orégano e IPF no Chroma a* de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 °C durante 12 dias.	64
Figura 21 - Efeito do óleo essencial de orégano e IPF no Chroma b* de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 °C durante 12 dias.	64
Figura 22 - Crescimento de micro-organismos psicrotróficos em fígado de frango armazenados a 4 ± 1 °C por 12 dias.....	66

NOMENCLATURA

ANOVA - Análise de variância;

ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária;

AOAC – Associação de análises químicas oficiais;

CLSI – Instituto de Normas de Laboratório Clínico;

Cm – centímetro;

CMS – Carne Mecanicamente Separada;

CMSF – Carne Mecanicamente Separada de Frango;

CRA – Capacidade de retenção de água;

CRO – Capacidade de Retenção de óleo;

DRX - Difração de Raios X;

DSC – Calorimetria diferencial de varredura;

DTA - Doenças transmitidas por alimentos;

E – Elongação;

F – Fisher;

FDA - Food and Drugs Administration, órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos;

FTIR – Espectroscopia no infravermelho;

FURG – Universidade Federal do Rio Grande;

G- glicerol;

g – Grama;

GL - graus de Liberdade;

GRAS - Geralmente Reconhecida como Segura;

h –hora;

HCl – ácido clorídrico;

IP – Isolado protéico;

IPF – Isolado protéico de frango;

KDa – Kilodalton;

Kg – Kilograma;

KV – kilovolts;

LTA – Laboratório de Tecnologia de Alimentos;

mA – miliampére;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

min – minuto;
mg – miligrama;
mL – Mililitro;
mm – milímetros;
MMT – Montmorilonita;
MQ - Quadrado Médio;
N – Newton;
n° - número;
NaCl – Cloreto de sódio;
NaOH –hidróxido de sódio;
nm – Nanômetros;
PVA – Permeabilidade ao vapor de água;
RT – Resistência à tração;
RDC – Resolução;
PRP – Programa de Redução de Patógenos;
s – segundo;
SQ - Soma Quadrática;
T – temperatura;
UFC – Unidade formadora de colônia;
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
μL – microlitro;
UV – ultravioleta;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Frango e Carne Mecanicamente Separada de Frango.....	16
3.2 Proteína de origem animal	16
3.3 Isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango	17
3.4 Filmes ativos	17
3.5 Filmes antimicrobianos.....	19
3.6 Plastificantes	19
3.7 Nanocompósitos.....	20
3.8 Nanoargilas	20
3.9 Óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	21
3.10 Contaminação microbiana	22
3.10.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	22
3.10.2 <i>Salmonella</i> Enteritidis	23
3.11 Aplicação de filmes	23
3.11.1 Miúdos de frango (fígado).....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Matéria-Prima	26
4.2 Infra-Estrutura.....	26
4.3 Reagentes	26
4.4 Procedimento Experimental.....	26
4.4.1 Obtenção do isolado protéico de CMSF	26

4.4.2	Obtenção de filmes nanocompósitos de isolado protéico de frango e nanoargilas ..	29
4.4.3	Aplicação de filmes bioativos	32
4.5	Metodologia Analítica	32
4.5.1	Composição proximal química.....	32
4.5.2	Caracterização do isolado protéico de CMSF	32
4.5.3	Caracterização físicas dos filmes	33
4.5.4	Análise da Atividade antimicrobiana dos filmes.....	36
4.5.5	Avaliação de fígado de frango aplicado com filmes ativos antimicrobianos.....	36
4.6	Tratamento dos Dados	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Caracterização da carne mecanicamente separada de frango	38
5.2	Obtenção do isolado protéico de frango	38
5.2.1	Composição proximal do isolado protéico.....	39
5.2.2	Solubilidade.....	40
5.2.3	Capacidade de Retenção de Água (CRA)	40
5.2.4	Capacidade de Retenção de Óleo (CRO)	42
5.2.5	Eletroforese	42
5.3	Desenvolvimento Preliminar dos filmes.....	43
5.4	Avaliação das propriedades dos filmes com montmorilonita	45
5.4.1	Espessura física	45
5.4.2	Propriedades físico-químicas	45
5.4.3	Propriedades Estruturais.....	53
5.5	Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes com montmorilonita e óleo essencial de óregano.....	60
5.6	Aplicação do filme em fígado com óleo essencial de óregano.....	62
5.6.1	Firmeza.....	62
5.6.2	Cor.....	63

5.6.3 Perda de Massa.....	65
5.6.4 Análise antimicrobiana.....	65
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICES	82

1. INTRODUÇÃO

Nas operações de cortes e desossa de aves sobram grande quantidades de subprodutos, provenientes de partes menos nobres (pescoço, dorso, ossos da coxa, pele e partes lesadas), cujo valor comercial é menor. Mas, nestes há ainda, significativa quantidade de carne, cuja retirada manual é economicamente viável. Dependendo do método de desossa manual utilizado e do tipo de subproduto, a percentagem residual da carne pode representar até 25% daquela existente na carcaça (BERAQUET, 2000)

A carne mecanicamente separada de frango (CMSF) é um co-produto da industrialização do frango. É um produto originado da trituração de partes das carcaças de animais de abate que não são facilmente desossados. Em decorrência da modernização tecnológica, a CMSF tem se expandido, principalmente, por sua facilidade de obtenção e transformação de produtos industrializados (GONÇALVES et al, 2009).

Os alimentos de origem animal, como as carnes, possuem proteínas de boa qualidade. As proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, além disso, poucos alimentos contêm proteínas com todos os aminoácidos essenciais, como as de origem animal. (OLIVEIRA e MARCHINI, 1998).

Proteínas concentradas e isoladas são produzidas em larga escala para servir como ingredientes funcionais em uma vasta e crescente gama de aplicações em alimentos. Ao substituir as proteínas convencionais, os concentrados e isolados protéicos, mantêm ou melhoraram a qualidade e aceitabilidade dos produtos que foram incorporados (HUA et al, 2005).

O interesse de manter, ou melhorar, a qualidade dos produtos embalados e, ao mesmo tempo, reduzir o desperdício de embalagens, tem encorajado a exploração de novos materiais de embalagens, como os filmes biodegradáveis formulados com matérias-primas oriundas de recursos renováveis (SOUZA, SILVA e DRUZIAN, 2012).

Dentre as matérias-primas pesquisadas, os biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, se apresentam mais promissores para o desenvolvimento de filmes, em razão de serem abundantes, renováveis, econômicos, e capazes de formar uma matriz contínua (QUINTERO e SOBRAL, 2000).

Tradicionalmente, as embalagens para alimentos têm sido planejadas para proteger o produto; um de seus principais objetivos é servir como uma barreira inerte entre o alimento e o ambiente. As tecnologias envolvendo embalagens ativas visam o planejamento de

embalagens que apresentem interações desejáveis com o produto, aumentando ou monitorando sua vida útil (MORAES et al., 2007).

O setor de pesquisa e desenvolvimento de filmes ativos com ação de agentes antimicrobianos para alimentos tornou-se uma empreitada ao longo das últimas décadas, proporcionando uma melhoria na diversificação de filmes no mercado (ROLF, 2007).

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 micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos (OJAGH et al., 2010).

Devido sua composição, o óleo essencial de orégano e seus princípios ativos têm sido amplamente utilizados em embalagens ativas com objetivo de conter contaminações microbiológicas (MURIEL-GALET et al., 2012). A adição de montmorilonita proporciona melhorias nas propriedades mecânicas e térmicas, bem como a propriedade de barreira a gases (TEDESCO, 2007) e pode ser adicionado a fim de obter embalagem com propriedades antimicrobianas (TUNÇ e DUMAN, 2010). Devido a isto, vêm sendo realizadas pesquisas com o objetivo de incorporar diferentes substâncias antimicrobianas a diferentes suportes poliméricos para obter filmes ativos (ZINOVIADOU, KOUTSOUMANIS e BILIADERIS, 2010).

Visando agregar valor aos subprodutos da industrialização de frango se tem a obtenção de isolado protéico de frango, para incorporar em embalagens que juntamente com nanocompósitos melhoram as propriedades e juntamente com antimicrobianos tem objetivo de aumentar a vida útil de alimentos embalados. Em face disso, o objetivo deste trabalho foi obter e avaliar filmes ativos nanocompósitos com propriedade antimicrobiana a partir de isolado protéico de frango com adição de montmorilonita.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter e avaliar filmes ativos nanocompósitos com propriedade antimicrobiana a partir de isolado protéico de frango com adição de montmorilonita.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar o isolado protéico proveniente da carne mecanicamente separada de frango (CMSF);
- Obter e avaliar filmes nanocompósitos de isolado protéico de CMSF com nanoargila, variando a concentração de isolado protéico, do plastificante, e da argila montmorilonita;
- Verificar a atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos com adição de montmorilonita;
- Verificar a atividade antimicrobiana dos filmes nanocompósitos obtidos comparados com filmes acrescentados de óleo essencial de orégano;
- Aplicar os filmes que apresentarem atividade antimicrobiana em miúdos de frango (fígado) e avaliar a vida útil do produto final.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Frango e Carne Mecanicamente Separada de Frango

A produção de carne de frango chegou a 12, 645 milhões de toneladas em 2012, com uma redução de 3,17% em relação a 2011. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno, e 31% para exportações. Com isto, o consumo per capita de carne de frango atingiu 45 quilos por pessoa (UBABEF, 2013).

Muitos fatores têm contribuído para o crescimento do consumo de carne de aves, tais como a modernização da produção e a diminuição do custo. Contudo, ao invés de frangos inteiro, há preferência pelo consumo de cortes específicos, o que gerou a necessidade do desenvolvimento de técnicas, como a produção de carne mecanicamente separada (CMS), para o aproveitamento de dorsos, ossos e carcaças. Atualmente, muitos produtos têm a CMS como matéria-prima (URBANSKI, LOBO e FERREIRA, 2010).

O processamento de carne mecanicamente separada (CMS) de aves, consiste na junção dos componentes descartados na desossa, através de um processo mecânico de trituração, para posterior utilização como matéria-prima na elaboração de produtos como empanados, hambúrgueres e salsichas. Esta alternativa se revelou economicamente importante e tem contribuído para o aumento do faturamento e da rentabilidade do setor avícola (URBANSKI, LOBO e FERREIRA, 2010). Quando no processamento da CMS, são respeitadas as boas práticas de fabricação, esta não apresenta riscos à saúde humana (MÓRI et al, 2006).

3.2 Proteína de origem animal

A carne de mamíferos contém 60-80% de água e 15-25% de proteína, sendo o restante formado principalmente por gorduras, carboidratos, sais, pigmentos e vitaminas. As proteínas da carne são classificadas quanto à sua função em: miofibrilares (actina e miosina), correspondentes a aproximadamente 55% da proteína total; tecido conjuntivo (colágeno e elastina), correspondente a aproximadamente 15% da proteína total e o restante formado por proteínas do sistema muscular involuntário (coração e demais órgãos) (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As proteínas podem ser consideradas os principais responsáveis pelas características funcionais da matéria primas cárneas. Nos produtos cárneos, são requeridas para uma grande variedade de funções. Irão determinar o rendimento, a qualidade, a estrutura e os atributos sensoriais (OLIVO e SHIMOKOMAKI, 2001).

De acordo com a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (2000) a CMS deve apresentar no mínimo 12% de proteína. Na literatura encontram-se valores de proteína para CMS variando de 9,3-14,5% de proteína, sendo a matéria-prima pescoço e dorso de frango (MÓRI et al, 2006).

3.3 Isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango

O isolamento de proteína é basicamente um processo de extração que visa obter um produto livre de interferentes (acima de 90% de proteína e menos de 1% de lipídios) e por ser um produto mais concentrado, este apresenta propriedades e características de conservação e uso diferentes (LOPES, 2005).

Isolado protéico de frango é um produto obtido através da hidrólise química e enzimática da proteína, a partir de CMSF ou outras matérias-primas protéicas, que pode ser utilizado como um suplemento nutricional na alimentação animal e humana. A proteína pode ser recuperada por solubilização química seguida de precipitação ao atingir o ponto isoelétrico (NOLSOE e UNDELAND, 2009).

Os concentrados e isolados protéicos têm sido produzidos em grande escala para servir como ingredientes funcionais em uma ampla e sempre crescente faixa de aplicação em alimentos. Quando substituem proteínas convencionais, os concentrados e isolados desenvolvidos poderão manter ou melhorar a qualidade e aceitabilidade dos produtos aos quais foram incorporados (HUA et al, 2005).

3.4 Filmes ativos

Filmes e/ou embalagens ativas são aquelas que interagem com o alimento, modificando alguma de suas propriedades, objetivando a segurança do alimento, qualidade sensorial e ampliando a vida útil do produto (SOARES, 1998). Os filmes de polímeros naturais podem ser definidos como camadas finas e contínuas formadas ou depositadas diretamente sobre os alimentos a partir de materiais biodegradáveis dependendo dos constituintes utilizados para sua elaboração e do tipo e da concentração dos componentes empregados visando atuar como embalagem e proteger o alimento (FAKHOURI et al., 2007).

O desenvolvimento de uma nova fonte de material de embalagem para substituir materiais não biodegradáveis à base de petróleo tem recebido crescente atenção. Além dos problemas ambientais causados por material não biodegradável, o custo do petróleo está cada vez mais elevado, e é outro motivo para o desenvolvimento de materiais substitutos. Polissacarídeos, proteínas, lipídios e suas misturas são considerados os biopolímeros mais promissores para este fim por causa de sua biodegradabilidade, sustentabilidade e abundância. Proteínas são abundantes subprodutos na indústria, é um biopolímero que tem recebido muita atenção para o uso como um material de embalagem de alimentos comestíveis ou biodegradáveis, uma vez que foi demonstrado que a produção de filmes transparentes e os revestimentos podem atuar como uma barreira excelente ao oxigênio e fornecer certas propriedades mecânicas (SOTHORNVIT e KROCHTA, 2000).

O uso desses materiais em embalagens para alimentos vai depender além de parâmetros como custo e disponibilidade de suas propriedades funcionais: propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas (cor e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidades ao vapor de água, ao O₂ e ao CO₂), solubilidade em água e propriedades sensoriais. Essas propriedades dependem do biopolímero utilizado (conformação, massa molar, distribuição de cargas, polaridade), das condições de produção (pH, concentração de proteínas na solução filmogênica, tratamento térmico da solução, tipo e teor de aditivos, como os plastificantes) e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa), importantes por causa da natureza higroscópica dos biopolímeros e do plastificante utilizados (SOBRAL, 2000).

Entre as propriedades dos filmes biodegradáveis podem ser mencionadas o transporte de gases (O₂ e CO₂) e de solutos, a retenção de compostos aromáticos e a incorporação de aditivos alimentícios, tais como: nutrientes, aromas, pigmentos ou agentes antioxidantes e antimicrobianos (PALMU et al., 2005).

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).

A escolha do material a ser utilizado na formulação dos filmes e revestimentos é muito importante, pois deste dependerão as interações entre os componentes do material, que poderão interferir nas propriedades de barreira, mecânicas e sensoriais dos filmes (MALI et al, 2010).

3.5 Filmes antimicrobianos

A crescente preocupação com a qualidade microbiológica dos alimentos tem aumentado o interesse pelos filmes antimicrobianos. A embalagem antimicrobiana é um tipo promissor de embalagem ativa que apresenta substância antimicrobiana incorporada ou imobilizada no material da embalagem que é capaz de eliminar ou inibir micro-organismos deterioradores e/ou patogênicos. O princípio básico de atuação dessa embalagem é a adição de uma barreira extra (microbiológica) às barreiras físicas (oxigênio e umidade) (HAN, 2003).

Uma das formas de controlar a multiplicação dos micro-organismos em produtos, com aumento da segurança dos alimentos, é a aplicação de antimicrobianos na superfície do produto (KERRY et al., 2006). A adição de agentes antimicrobianos em filmes poderão permitir a extensão do prazo de validade e aumentar a segurança dos alimentos embalados, inibindo o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos ou deterioração do alimento (SALGADO et al, 2013).

A liberação de aditivos por embalagens ativas e antimicrobianas aumenta a segurança do consumidor, uma vez que esses compostos, ao invés de diretamente adicionados ao alimento, são liberados de maneira controlada em sua superfície. Este controle se dá pelo tempo de contato do produto com relação ao processo de difusão. Desta forma o aditivo se encontra em menor quantidade apenas onde sua presença é requerida, isto é, na superfície do produto, onde a maior parte das deteriorações ocorrem e onde se encontra uma maior contaminação microbiana (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

Os filmes ativos com função antimicrobiana baseiam-se na incorporação de conservantes alimentares na estrutura do polímero durante o processo de produção de filmes objetivando reduzir, inibir ou retardar o crescimento da microbiota presente, principalmente na superfície do alimento embalado, onde a maior parte das reações de deterioração ocorre, além de adicionar características desejáveis ao alimento (SOARES et al, 2009).

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 micro-organismos, fisiologia do micro-organismo-alvo, processo de fabricação do material de embalagem, processabilidade do material de embalagem e aspectos relacionados à legislação (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

3.6 Plastificantes

Os plastificantes mais indicados para serem empregados em filmes são os polióis, como glicerol e sorbitol, pois são substâncias não voláteis, que quando adicionados ao

material do filme alteram suas propriedades mecânicas e físicas. A estrutura, composição, massa molecular e grupos funcionais dos plastificantes podem afetar o grau de plasticidade dos filmes biopoliméricos (CAO et al, 2009).

Os plastificantes devem ser compatíveis com o biopolímero e, geralmente, são adicionados na proporção de 10 a 60 g/ g matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (MALI et al, 2010).

Desde 1959, o glicerol é reconhecido como uma substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos e também como substância “GRAS”, pela agência Food and Drugs Administration (FDA) dos Estados Unidos. No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de nº 386, de 5 de agosto de 1999 (ARRUDA et al, 2006).

3.7 Nanocompósitos

Nanocompósitos são uma classe de compósitos que contém pequenas quantidades, em geral abaixo de 5% em massa, de nanopartículas de reforço, com ao menos uma de suas dimensões da ordem de grandeza do nanômetro, ou seja, medem entre 1 e 100 nm (JORDAN et al, 2005).

Tal associação entre biopolímeros e nanopartículas tem o objetivo de obter efeitos sinérgicos, é uma das vias mais inovadoras para melhorar as propriedades destas matrizes. Dependendo da geometria e da natureza da nanopartícula, novas propriedades são melhoradas como barreira ao gás, rigidez mecânica, transparência, estabilidade térmica (CHIVRAC et al., 2010).

Um avanço significativo na área de filmes tem ocorrido com a preparação de nanocompósitos, onde a ordem estrutural dentro do material pode ser controlada em escala nanométrica. O comportamento hidrófilo da maioria dos polímeros naturais oferece uma significativa vantagem, já que este proporciona uma interface compatível com as argilas (YU e DEAN, 2006).

3.8 Nanoargilas

Neste campo, tem sido dada especial atenção à montmorilonita (MMT) por causa de suas partículas pequenas, área superficial extremamente larga e boas propriedades de intercalação. A montmorilonita é composta de camadas de silicato com aproximadamente 1nm de espessura na estrutura planar e entre 200 e 300 nm de dimensão lateral. Sua estrutura

química típica consiste em duas camadas tetraédricas de sílica circundando uma camada octaédrica de hidróxido de alumínio ou magnésio (SCHLEMMER, 2009).

Com adição de argila entre 2 e 10 % os nanocompósitos já podem apresentar significativas melhorias em suas propriedades mecânicas, de barreira e ópticas. Esta vantagem de adição de menor teor de argila, em comparação aos compósitos tradicionais, implica na produção de componentes mais leves, o que é um fator desejável em muitas aplicações. Outras propriedades interessantes normalmente apresentadas pelos nanocompósitos de polímero/argila são a maior estabilidade microbiana (SOUZA, PESSAN e JUNIOR, 2006).

A principal razão para as diferenças no desempenho entre materiais compósitos e nanocompósitos está relacionada com a elevada área superficial destes últimos, resultando em elevada interação entre a matriz e as nanopartículas (RAY e OKAMOTO, 2003).

3.9 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Os óleos essenciais são obtidos através de destilação/extração a partir de plantas, sementes, folhas, frutos e raízes. São compostos hidrófobos, aromáticos, líquidos e parcialmente voláteis. Sua utilização como ingrediente aumentou devido a sua capacidade antibacteriana, antifúngica, antiviral, bem como propriedades inseticida e antioxidante (BURT, 2004).

A inibição atribuída pelos óleos essenciais pode ser devido aos componentes desses óleos (limoneno, tomilho fenol, aldeído), que pode ser capaz de interromper e penetrar a estrutura da membrana celular de bactérias, causando a sua destruição (TURINA et al, 2006).

Dentre tantos óleos essenciais, destaca-se o óleo de orégano, em que o carvacrol, seu componente majoritário, é de extrema importância, pois possui potencial antimicrobiano e pode atuar como conservantes de alimentos (VELDHUIZEN et al, 2007).

A ação das substâncias antimicrobianas do óleo essencial de orégano é geralmente atribuída a danos causados na estrutura e funções das propriedades da membrana citoplasmática dos micro-organismos. O carvacrol atua diretamente na degradação da camada fosfolipídica, gerando uma perda de sua estrutura e conseqüente extravasamento de material celular, causando lise e morte da célula (ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002).

A atividade antimicrobiana da espécie *Origanum vulgare* é caracterizada pela alta quantidade de compostos fenólicos presentes nessa planta. (OLIVEIRA et al, 2009). Estudos relatam, que o óleo essencial de orégano apresenta resultados importantes na inibição do

crescimento de bactérias e fungos. SANTURIO et al (2007) e SILVA et al (2010) comprovaram que a multiplicação de *Salmonella* Enteritidis pode ser inibida por óleo essencial de orégano.

3.10 Contaminação microbiana

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

A maioria dos casos de DTA, porém, não é notificada, pois muitos micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos causam sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico (COSTALUNGA e TONDO, 2002).

Entre as causas mais frequentes de contaminação dos alimentos, destacam-se a manipulação e a conservação inadequadas dos mesmos, além da contaminação cruzada entre produtos crus e processados (MÜRMAN et al, 2008).

Alimentos contaminados por pequenas quantidades de micro-organismos podem não causar surtos alimentares, porém se forem conservados em condições que permitam a multiplicação desses agentes microbianos, as chances para a ocorrência de surtos aumenta significativamente (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo YAU, FRAUSTO e YAMAGUCHI (2009) micro-organismos de grande importância são aqueles que garantem à segurança alimentar, são indicadores de qualidade e demonstraram-se dentro de padrões das normas e regulamentos vigentes, entre eles estão a *Salmonella sp.* e *Listeria sp.*

3.10.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria é uma bactéria Gram-positiva não formadora de esporos e em formato de bastonete, amplamente distribuída na natureza, com habilidades para sobreviver em diferentes ambientes (RADOSTITS et al., 2002). O gênero *Listeria* é vastamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no solo, fezes de animais, vegetação, água, entre outros (JAY, 2005).

Bactérias do gênero *Listeria*, principalmente *L. monocytogenes*, são utilizadas como indicadores higiênicos em todos os estágios da cadeia de processamento de alimentos. É um micro-organismo de ampla distribuição ambiental, possui capacidade de tolerar pH extremos, de se desenvolver e multiplicar em uma ampla faixa de temperatura (0 °C a 44 °C) e em ambientes com baixa atividade de água e concentrações elevadas de NaCl. Este conjunto de

características faz com que seja considerado um patógeno emergente de grande importância na área de alimentos (APHA, 2001).

De todas as espécies de *Listeria*, a *Listeria monocytogenes* é a de maior importância para a microbiologia de alimentos, pois é patógena. Acredita-se que a dose requerida para causar doenças nos indivíduos seja de 100-1000 células. Os produtos cárneos são um dos principais alimentos envolvidos em surtos de listeriose (WARRIENER e NAMVAR, 2009).

3.10.2 *Salmonella* Enteritidis

Salmonelas são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Sua temperatura ótima de crescimento é 37 °C, multiplicam-se na faixa de pH entre 4,5 e 9,5, em atividade de água acima de 0,93 e possuem mecanismos de adaptação a condições ambientais adversas (D'AOUST, 2001).

O gênero *Salmonella* consiste em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (POPOFF e LE MINOR, 1997). A *Salmonella enterica* possui as subespécies Typhimurium e Enteritidis que são os mais envolvidos em salmonelose humana (VUGIA et al, 2004).

A transmissão de salmonela ao homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos ou água contaminados (FAVRIN, JASSIM e GRIFFITHS, 2001). Segundo a FDA (2003) a dose infectante depende dos alimentos envolvidos e do estado fisiológico do hospedeiro, cerca de 15 células de salmonelas já podem causar a doença em pacientes imuno comprometidos e/ou quando ingeridos com alimentos gordurosos. Entretanto, a dose infectante em condições normais é de aproximadamente 10⁵ células.

A Instrução Normativa nº 70, de 06 de Outubro de 2003, instituiu o Programa de Redução de Patógenos (PRP) pelo monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella sp.* em carcaças de frangos e perus. A amostragem de carcaças analisadas é baseada na quantidade de aves abatidas diariamente pelo abatedouro (BRASIL, 2003).

3.11 Aplicação de filmes

A função principal dos filmes é atuar como embalagem, a fim de proteger e retardar a deterioração, aumentar a vida útil e a manutenção da qualidade e segurança dos alimentos embalados. A embalagem protege de influências ambientais que causam a deterioração de alimentos e bebidas (MARSH e BUGUSU, 2007).

A aplicação de embalagens ativas está sendo desenvolvida para proporcionar qualidade e segurança antimicrobiana aos produtos acondicionados (MORAES et al, 2011).

Essas embalagens interagem com o produto acondicionado objetivando melhorar sensorialmente e/ou estender a vida útil dos produtos (SOARES et al., 2009).

Este é o conceito básico de embalagens ativas, embora tenha sua interação deliberada com o alimento e/ou a sua tecnologia com o meio ambiente isso representa novos desafios para a avaliação da segurança destas embalagens, em comparação com a embalagem tradicional, isto é, migração de substâncias de embalagens para alimentos, uso incorreto da embalagem e a operação da embalagem não eficaz (ROSCA e VERGNAUD, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado eficiência e aplicabilidade das embalagens ativas antimicrobianas. Santiago-Silva et al. (2009) avaliaram a eficiência antimicrobiana de filmes incorporados com pediocina (ALTA 2551) na preservação de presunto fatiado. MORAES et al (2011) comprovou que filme incorporados com aroma de pizza teve efeito antimicrobiano quando aplicados na massa de pastel. MORAES et al. (2007) demonstraram que filmes ativos incorporados com ácido sórbico são efetivos contra o crescimento de fungos filamentosos e leveduras em manteiga.

Os filmes ativos antimicrobianos vêm sendo muito utilizados na aplicação em alimentos (MORAES et al, 2011).

3.11.1 Miúdos de frango (fígado)

É possível enumerar uma série de fatores que favorecem o consumo da carne de frango, como: alto valor nutritivo, fácil digestibilidade, economicamente acessível, menor valor calórico e nível de colesterol quando comparados à carne bovina. No entanto, por ser rico em nutrientes constitui-se em alvo fácil de bactérias que podem causar deterioração, redução do prazo de vida comercial e ocorrência de surtos alimentares (LEITE e FRANCO, 2006)

A carne possui uma microbiota muito variada, sendo que na carne de aves podem ser isoladas bactérias mesófilas produtoras de toxinfecções alimentares como *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum* e *perfringens*, *Campylobacter* sp.; *Escherichia coli* e ainda *Listeria monocytogenes* (SILVA, 1998).

A RDC N° 12/01 da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), considera que a presença de *Salmonella* spp. em carnes de aves e seus miúdos crus (fígado, moela, coração, entre outros), resfriados ou congelados, é um problema mundial e que não existem medidas efetivas de controle que possam eliminar esta bactéria da carne crua. As indústrias produtoras de carne de aves e seus miúdos não asseguram a eliminação completa desse micro-

organismo nesses produtos, e a presença da *Salmonella* spp. significa risco à saúde do consumidor caso o produto não seja adequadamente conservado e preparado.

Segundo CARVALHO, LIMA e PEREIRA (2002), o frango constitui de fontes potenciais de bactérias, onde os miúdos são as partes mais contaminadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

Carne mecanicamente separada de frango (CMSF), fornecida pela Companhia Minuano Alimentos, localizada em Arroio do Meio, RS, Brasil. A CMSF foi transportada congelada a -10°C em blocos de 10 kg até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizado em Rio Grande, RS, Brasil e depois armazenada em congelador (CONSUL, 530) à temperatura de -20 °C, armazenado até a obtenção do isolado protéico.

4.2 Infra-Estrutura

Para o processo, determinações e desenvolvimento deste trabalho foram utilizados o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), a Planta de Processamento de Pescados e outros laboratórios do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), além do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS.

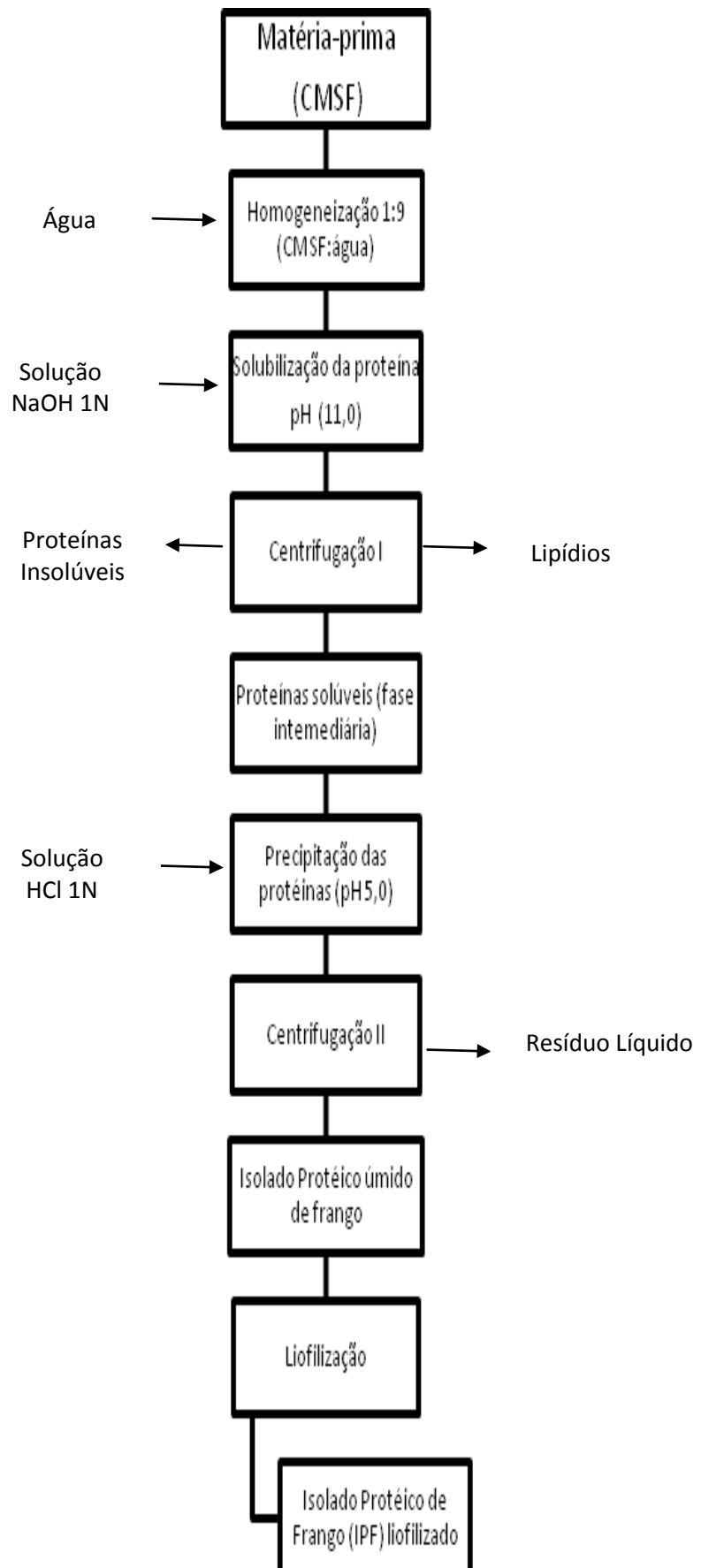
4.3 Reagentes

Os reagentes químicos utilizados para as análises foram de qualidade padrão (P.A).

4.4 Procedimento Experimental

4.4.1 Obtenção do isolado protéico de CMSF

O isolado protéico de CMSF foi obtido utilizando o processo de variação de pH segundo metodologia adaptada para frango, de MORAES (2009) e NOLSOE e UNDELAND (2009). A Figura 1 apresenta o fluxograma do processo de obtenção do isolado protéico.

Figura 1- Fluxograma do processo de obtenção de isolado protéico de frango

- Homogeneização

A CMSF foi homogeneizada com água destilada na proporção de 1:9 a 4 °C durante 60 s em agitador de eixo-hélice (Fisatom, 713D).

- Solubilização das proteínas

No tratamento alcalino, o hidróxido de sódio (NaOH 1N) foi empregado como agente alcalinizante e realizado em pH 11,0, controlado em pHmetro (Marconi, PA200) e temperaturas de 4 °C controlada em banho ultra termostático (Solotest, Q214M2). A solubilização protéica ocorrerá durante 20 min.

- Centrifugação I

A centrifugação foi realizada em centrífuga refrigerada (Hanil, CR22GIII) com velocidade de 10.000 xg a 7 °C por 20 min. Nesta etapa foram separadas três fases: inferior, contendo as proteínas insolúveis; fase intermediária, contendo as proteínas solúveis e a fase superior, contendo os lipídios.

- Recuperação das proteínas

A fase intermediária obtida na centrifugação I, correspondente às proteínas solúveis, estas foram submetidas à precipitação isoeletrica a pH 5,0 controlado em pHmetro (Marconi, PA200) a temperatura de 4 °C controlada em banho ultra termostático (Solotest, Q214M2) por um período de 20 min. As outras duas fases, correspondentes às proteínas insolúveis e aos lipídios, foram descartadas.

- Centrifugação II

A centrifugação II foi realizada da mesma maneira que a centrifugação I utilizando os mesmos parâmetros, velocidade de 10.000 xg a 7 °C por 20 min, para separar a fração solúvel (resíduos líquidos) da fração insolúvel ou protéica, facilitando a coleta das proteínas precipitadas.

- Liofilização

O concentrado protéico de CMSF foi submetido à desidratação no qual as amostras foram mantidas em ultra freezer (Indrel, IULT90-D) à temperatura de -70 °C/24h, e logo liofilizadas por 48h, utilizando liofilizador (Liotop, L108).

- Armazenamento

O armazenamento do isolado protéico foi realizado em recipientes de vidro hermeticamente fechados à temperatura ambiente durante todo desenvolvimento do trabalho.

4.4.2 Obtenção de filmes nanocompósitos de isolado protéico de frango e nanoargilas

4.4.2.1 Testes Preliminares

A partir de uma formulação básica para filme com 3,5 g de IPF, 30% de glicerol.100 g⁻¹ de IPF e 0,5 g de montmorilonita foram realizados testes preliminares para escolha da melhor temperatura de aquecimento da solução filmogênica 70, 80 e 90 °C.

4.4.2.2 Planejamento Experimental

Para o desenvolvimento de filmes ativos de isolado protéico de CMSF foi executado um planejamento experimental de 2³, com 3 pontos centrais e pontos axiais, conforme apresentado na Tabela 1. Foi aplicada metodologia de superfície de resposta para estudar os efeitos simultâneos das variáveis independentes sobre as respostas.

Os níveis de concentração de isolado protéico de CMSF, montmorilonita (MMT), plastificante glicerol, temperatura e tempo de secagem foram escolhidos através do levantamento bibliográfico. CORTEZ-VEJA et al (2013) variou a concentração de isolado protéico de corvina (IPC) em 2; 3,5; 5 g.100 g⁻¹ de solução, de montmorilonita em 0,3; 0,5; 0,7 g.100 g⁻¹ de solução e glicerol em 25, 30, 35 g.100 g⁻¹ IPC. ROCHA et al (2013) variou o isolado protéico de anchoita (IPA) em 3;3,5 e 4 g.100 g⁻¹ de solução e glicerol em 30,35 e 40 g. 100 g⁻¹ IPA.

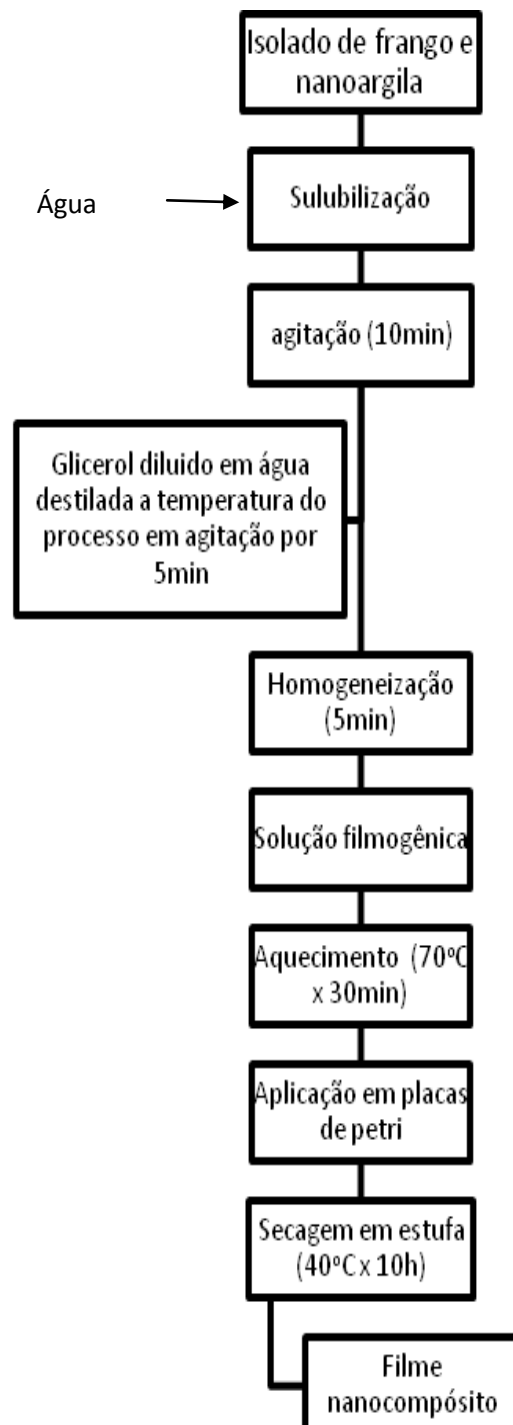
Tabela 1- Variáveis utilizadas no planejamento experimental para desenvolvimento dos filmes nanocompósitos de isolado protéico de frango e nanoargilas.

Variáveis reais	Variáveis codificadas				
	-1,68	-1	0	1	1,68
IPF (g)*	1,0	2,0	3,5	5,0	6,0
Glicerol (g)*	0,2	0,5	1,0	1,5	1,8
MMT (g)*	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8

*g em relação a 100mL de solução. IPF: Isolado protéico de CMSF, MMT: Montmorilonita.

Os filmes bioativos foram obtidos pela técnica de *casting*, onde cada solução dos filmes foi preparada segundo planejamento experimental da Tabela 1. A Figura 2 apresenta o fluxograma que foi utilizado para a obtenção de filmes ativos nanocompósitos de IPF e montmorilonita (MMT).

Figura 2 - Fluxograma do processo de obtenção de filme nanocompósito de isolado protéico de frango e nanoargilas.



- **Dispersão**

Foi disperso o isolado protéico de frango (IPF) em água destilada e mantido sob agitação suave e constante por 10 min em agitador eixo-hélice (Fisatom, 713D) a temperatura da solução filmogênica, 70 °C, para hidratação do IPF. Foi ajustado a pH 11,0 com hidróxido de sódio 1N, mantendo agitação constante por 10 min.

- **Adição de MMT e Glicerol**

Adicionada a MMT (Montmorillonite K 10, Sigma Aldrich) a temperatura foi mantida. Após a completa dissolução do IPF e MMT, foi adicionado o glicerol previamente solubilizado em água destilada na mesma temperatura da solução filmogênica e mantendo o pH.

- ***Casting***

A solução filmogênica foi misturada no homogeneizador (IKA ULTRA-TURRAX, T25D) por 10 min e logo aquecida à 70 °C por 30 minutos. Após foi espalhada em placa de Petri de policarbonato com diâmetro de 9 cm e submetida à secagem em estufa a 40 °C por 10h com circulação de ar (FANEM, 520).

- **Armazenamento**

Após a secagem dos filmes, estes foram armazenados por 24h em dessecadores mantidos a 25 °C e umidade relativa de 55% controlada usando solução saturada de cloreto de cálcio.

4.4.2.3 Filmes de óleo essencial de óregano

A fim de comparar a atividade antimicrobiana dos filmes a partir de isolado protéico de frango com outro agente antimicrobiano diferente da montmorilonita, foram preparados filmes com IPF e óleo essencial de orégano. Os filmes foram desenvolvidos pela técnica de *casting*, conforme foi apresenta na Figura 2, diferenciando o tempo de secagem em estufa, neste caso a 40 °C por 8h com circulação de ar (FANEM, 520) e os componentes da solução filmogênica, neste caso IPF, glicerol e óleo essencial de óregano.

4.4.3 Aplicação de filmes bioativos

A partir do estudo da ação antimicrobiana dos filmes ativo de IPF, os filmes que apresentaram ação antimicrobiana foram aplicados em miúdos de frango (fígado) devido sua susceptibilidade de contaminação e avaliado quanto a sua qualidade microbiológica, avaliando o produto embalado conforme as análises mencionadas no item 4.5.5.

As peças de fígado foram cortadas em pequenos pedaços (2,1 x 2,5 x 1,0 cm) de aproximadamente 5,0 g utilizando uma faca de aço inoxidável estéril. Estes foram envoltos assepticamente, em forma de cruz, pelos filmes antimicrobianos cobrindo toda a superfície da carne. As amostras controle foram embaladas em filmes sem agente antimicrobiano. As amostras de carne foram colocadas em placas de Petri estéreis e armazenadas a $4,0 \pm 1,0$ °C por 12 dias para posterior caracterização.

4.5 Metodologia Analítica

4.5.1 Composição proximal química

Esta análise foi realizada para a matéria-prima e para o isolado protéico de CMSF, determinada pelos métodos da AOAC (2000), onde o conteúdo de umidade foi determinado de acordo com o método gravimétrico em estufa a 105°C, n° 935.29; o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, n° 920.87, sendo o teor de proteína bruta obtido através da multiplicação pelo fator 6,25; o conteúdo de lipídios foi obtido pelo método de Soxhlet, n° 920.85 e cinzas, por método gravimétrico, n° 923.03 em mufla a 500-600°C.

4.5.2 Caracterização do isolado protéico de CMSF

O isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango foi avaliado quanto às propriedades citadas nos itens abaixo.

4.5.2.1 Eletroforese

Foram desenvolvidos os géis, o gel de separação e o gel de concentração. Após foi feito o preparo da amostra, dissolveu-se as amostras em 1,5 mL de água destilada para formar uma solução com 0,2% de proteína; adicionou-se às amostras 1,5 mL de tampão (sample buffer) para que ficasse na proporção de 1:1; agitou-se em vórtex os tubos até dissolver as amostras; pipetou-se 1 mL de amostra para o eppendorf e adicionou-se 100 µL de β-mercaptoetanol; colocou-se os eppendorfs com as amostras em água fervente por 4 min para desnaturar as proteínas; após esfriar colocou 3 gotas de tracking dye (azul de

bromofenol); 20 µL de amostra em cada poço e 10 µL de SDS Market (padrão) nos primeiros espaços de cada lado dos géis.

4.5.2.2 Capacidade de Retenção de Água e Óleo (CRA e CRO)

A metodologia para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) e da capacidade de óleo (CRO) foi adaptada da metodologia descrita por FREITAS et al (2011). Para CRA 0,36 g de amostra foi dispersa em 36 mL de água destilada e 2 mL de NaCl 0,1M, foi ajustado o pH (3; 5; 7; 9 e 11) com adição de HCl e NaOH e após submetido a centrifugação e filtração, anotando sua massa inicial e final. Para CRO pesou-se 0,5 g da amostra adicionada de 10 mL de óleo de soja, submetido a agitação em vórtex e após centrifugação. Ambos resultados foram expressos em quantidade de água/óleo retido em gramas por massa de proteína inicial em gramas.

4.5.2.3 Solubilidade

Determinada de acordo com o método utilizado por MOOR et al. (1985) com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Pesou-se 0,5 g de amostra, adicionou-se 2 mL de NaCl 0,1M e 48 mL de água destilada. O pH foi ajustado com HCl 1N e NaOH 1N. A dispersão foi mantida sob agitação por 30 min em agitador magnético (modelo), em seguida centrifugou-se a dispersão a 8667xg por 20 min em centrífuga de tubos (modelo). O teor de proteínas solúvel no sobrenadante foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com LOWRY et al. (1951). A solubilidade da proteína foi calculado conforme a equação 1.

$$\% S = \left(\frac{\text{Quantidade de proteína no sobrenadante}}{\text{Quantidade de proteína na amostra}} \right) \times 100 \quad (1)$$

4.5.3 Caracterização físicas dos filmes

Os filmes bioativos desenvolvidos com carne mecanicamente separada de frango foram avaliados quanto a suas propriedades físicas.

4.5.3.1 Espessura

Durante os tratamento preliminares foi determinada a espessura dos filmes, esta obtida utilizando um paquímetro digital (INSIZE, IP 54) com resolução 0,0100±0,0005 mm. A espessura foi fixada como sendo a média aritmética de 5 medidas aleatórias sobre a área do filme.

4.5.3.2 Opacidade

A opacidade dos filmes foi obtida utilizando-se espectrofotômetro UV visível (Biospectro, SP-22) e calculada através da equação 2:

$$Opacidade = \frac{A_{450}}{X} \quad (2)$$

Onde A_{450} é a absorbância em 450 nm, dada pela fórmula $A_{450} = -\log T$ e X é a espessura do filme (nm).

4.5.3.3 Propriedades mecânicas

A resistência a tração (RT) e alongação na ruptura (E) foi realizada de acordo com o método padrão da American Society for Testing and Materials, ASTM D-882 (ASTM, 2001). Em um texturômetro (Stable Micro System, TA.XT plus) foi inserido um corte do filme com largura de 2,5 cm e comprimento de 9 cm, onde foi submetido a uma força esticando o filme até a sua ruptura. A resistência a tração foi expressa em MPa e Elongação em %.

4.5.3.4 Permeabilidade ao vapor de água

Ensaio de permeabilidade ao vapor de água (PVA) foram realizados gravimetricamente a 25 °C, de acordo com o método E96-95 (ASTM, 1995). Os filmes foram acoplados com solução de CaCl₂, previamente secos em estufa a 105 °C por 2h, e armazenados em dessecador com umidade relativa de 75%, durante 8 dias, pesando-se a cada 24h. O cálculo para PVA foi realizado conforme a equação 3.

$$P = \frac{M \cdot L}{t \cdot A \cdot \Delta P} \quad (3)$$

Onde M é a massa de umidade absorvida (g); t é o tempo em dias; L é espessura em mm; A é a área em m² e ΔP é a variação de umidade relativa em KPa.

4.5.3.5 Solubilidade

A solubilidade em água foi determinada nos filmes em triplicata segundo o método de FAKHOURI et al (2007). Os filmes foram cortados em quadrados de 2x2 cm, e foi

determinada a porcentagem inicial de matéria seca da amostra, em estufa a 105 °C por 24h. Após a pesagem, as amostras foram imersas em recipientes com 25 mL de água destilada, e agitadas lentamente e periodicamente por 24h. Após esse período, as amostras foram removidas e secas (105 °C por 24h), para determinação da massa da matéria seca que não se dissolveu na água.

4.5.3.6 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Os filmes foram analisados conforme metodologia Refletância Atenuada FTIR-ATR, usando equipamento espectrofotométrico no infravermelho (Prestige, 210045-Japão) com 40 varreduras no Laboratório de Síntese e Catálise Inorgânica da Universidade Federal do Rio Grande.

4.5.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de filmes foram analisadas para determinar as características de superfície usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Japão) operando a 15kV. Cinco amostras foram colocadas sobre um tubo de bronze e revestidas de camada de ouro antes de obter as imagens. As fotografias foram tiradas com 10000x de ampliação. Esta análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (Ceme-Sul) da Universidade Federal do Rio Grande.

4.5.3.8 Difração de Raios X (DRX)

As análises de difração de Raios X (DRX) foram obtidas utilizando um difratômetro (Siemens D500 de geometria Bragg-Brentano) com radiação de Cu, operando a 40kV e 17,5 mA, monocromador de grafite para feixe de raios X difratado. As medidas foram obtidas com passos de 0,05 graus (2θ), tempo de contagem de 5 s/passos, e com intervalos de medida em 2θ de 2 a 60 graus. A análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

4.5.3.9 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises térmicas foram realizadas em termobalança (Shimadzu, TGA-60, Japão) com fluxo de nitrogênio 50 mL.min⁻¹, usando porta-amostra de alumínio com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. A massa de amostra foi de aproximadamente 5 mg na faixa de

temperatura de 30 a 250 °C. Esta análise foi realizada no Laboratório de Operações Unitárias da Universidade Federal do Rio Grande.

4.5.4 Análise da Atividade antimicrobiana dos filmes

Para avaliar a eficácia antimicrobiana, foram testados os filmes de IPF com montmorilonita e óleo essencial de orégano frente aos micro-organismos *Salmonella* Enteritidis J11 e *Listeria monocytogenes* SE86. Esta análise foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e as cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos de Porto Alegre - RS.

A análise foi realizada em triplicata pelo método de difusão em discos segundo a CLSI (2003). Pelo menos de três a cinco colônias, isoladas, do mesmo tipo morfológico foram selecionadas da placa de ágar. A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça, e os microorganismos foram transferidos para um tubo contendo 9 mL de um meio de cultura adequado, como caldo de soja tríplica. Incubou-se a cultura em caldo, a 35 °C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5. Isso resultou numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de micro-organismo. Porém, estas foram diluídas até 10⁻⁵, para obter assim uma concentração menor de 1 a 2 x 10³ UFC/mL.

Em condições ideais se faz *swab* no ágar Muller Hilton inserido na placa, o disco antimicrobiano foi colocado na superfície da placa de ágar.. Cada disco foi pressionado sobre a placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35 °C, até 15 min após a aplicação dos discos. Após 16-18h de incubação, examinou-se cada placa.

Halos de inibição foram observados ou não, a olho nu. Os halos foram relatados em milímetros e medidos com paquímetro. Foi preparado também um filme controle sem adição do agente antimicrobiano.

4.5.5 Avaliação de fígado de frango aplicado com filmes ativos antimicrobianos

Após a análise da atividade antimicrobiana do filme nanocompósito de IPF com adição de montmorilonita e do filme com IPF e óleo essencial de orégano, os filmes que apresentaram efeito positivo foram aplicados em miúdos de frango (fígado), e foram feitas análises que caracterizam a qualidade do produto final.

As amostras foram avaliadas quanto a cor, textura, perda de massa e qualidade microbiológica no tempo de zero, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento.

4.5.5.1 Firmeza

Foi determinada a firmeza utilizando um texturômetro (Stable Micro System, TA.XT plus) com ponteira cilíndrica movimentada na velocidade de 4 mm.s⁻¹ no pré-teste, 8 mm.s⁻¹ no pós-teste, e 2 mm.s⁻¹ de teste, até a profundidade de 5 mm. Os resultados foram expressos em Newton (N).

4.5.5.2 Cor

Foi avaliada utilizando-se colorímetro (Minolta, CR-400) e detecção dos parâmetros: luminosidade L*, de 0 (preto) a 100 (branco); cromaticidade, Chroma, onde a* varia de verde (-60) a vermelho (+60) e b* de azul (-60) a amarelo (+60).

4.5.5.3 Perda de Massa

Foi obtida relacionando-se a diferença entre o peso inicial do produto e obtido ao final de cada tempo de armazenamento (zero, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias). Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de massa.

4.5.5.4 Atividade antimicrobiana no fígado de frango

A análise microbiológica foi conforme SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA (1997), o filme foi cuidadosamente removido e adicionado na solução de água peptonada 0,1% (p/v) para lavar os micro-organismos que podem ser ligados a sua superfície. Diluições decimais foram preparadas até 10⁻⁴ e espalhadas 0,1 mL em placa contendo ágar padrão para contagem (PCA) para a contagem total de micro-organismos psicrotróficos, incubadas a uma temperatura de aproximadamente 25 °C durante 48h. Para os cortes de carne foram realizadas a análise em duplicata de cada tratamento e foram analisadas quanto à sua microflora, em cada tempo. O resultado final foi expresso em UFC.g⁻¹.

4.6 Tratamento dos Dados

Para determinar diferença, estatisticamente, significativa com 95% de confiança entre médias (p≤0,05), foram utilizadas análises de variância e teste de Tukey. Para o desenvolvimento de filmes foi aplicada metodologia de superfície de resposta para estudar os efeitos simultâneos das variáveis independentes, sobre as respostas, usando o Programa Statistica 5.0 (Statsoft, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da carne mecanicamente separada de frango

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos da composição proximal química da CMSF para execução desse trabalho, comparadas com as composições obtidas por outros autores.

Tabela 2 - Composição proximal de carne mecanicamente separada de frango (b.s: base seca)

Componente (%)	CMSF b.s* (este trabalho)	MORAES (2009)	GONÇALVES et al (2009)	ROSSI (2007)	ROSSI et al (2009)
Proteína	39,53 ± 0,55	37,66	45,17	34,16	32,54
Lipídios	54,95 ± 0,66	55,70	48,43	56,85	55,57
Cinzas	3,46 ± 0,10	2,38	3,07	2,47	2,14

*Média dos resultados da triplicata ± o desvio padrão

A partir dos valores apresentados na Tabela 2, pode-se verificar que os resultados obtidos para matéria-prima de CMSF deste trabalho concordam com os dados citados por outros autores, apresentou proteína aproximada a de MORAES (2009), lipídios próximo a MORAES (2009) e ROSSI et al (2009), cinzas com valor aproximado a GONÇALVES (2009). Essas variabilidades podem ser pelo fato de que a CMSF varia sua composição proximal, devido a diversos fatores tais como idade das aves, relação carne-osso, conteúdo de pele, método de corte, processo de desossa mecânica, desnaturação da proteína e quantidade de pigmentos (PERLO et al, 2005).

A composição encontrada para a CMSF deste trabalho está dentro dos parâmetros exigidos pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento pela instituição normativa 4 de 2000 (BRASIL, 2000) que dispõe que em base úmida a CMSF deve apresentar um mínimo de 12% de proteína e máximo de 30% de gordura. E em base úmida a composição para CMSF foi umidade 68,81%, proteína 12,33%, lipídios 17,14% e cinzas 1,08%.

5.2 Obtenção do isolado protéico de frango

Foi obtido o isolado protéico pela solubilização alcalina de carne mecanicamente separada de frango cominutada a pH 11,0 da proteína e precipitação no ponto isoelétrico em pH 5,0. O isolado utilizado para as posteriores análises foi com uma umidade de

aproximadamente 3%, obtido após a liofilização. Obteve-se um rendimento de 70% de isolado proteico.

5.2.1 Composição proximal do isolado protéico

A Tabela 3 apresenta a composição proximal da matéria prima, carne mecanicamente separada de frango (CMSF) e do isolado protéico de CMSF. Observa-se, em base seca, o percentual de proteína de 80% e o percentual de lipídios de 5,3 % no isolado protéico.

Tabela 3 - Composição proximal da carne mecanicamente separada de frango e do isolado proteico de frango.

Componente	CMSF*		Isolado protéico*	
	BU**	BS**	BU**	BS**
Umidade	68,81 ± 1,09		89,9 ± 0,11	
Proteína	12,33 ± 0,55	39,5 ± 0,55	8,2 ± 2,07	82,8 ± 2,07
Lipídios	17,14 ± 0,66	54,9 ± 0,66	0,53 ± 0,59	5,4 ± 0,59
Cinzas	1,08 ± 0,10	3,4 ± 0,10	0,16 ± 0,02	1,6 ± 0,02

*Média dos resultados da triplicata ± desvio padrão em base úmida e base seca

** BU: base úmida; BS: base seca

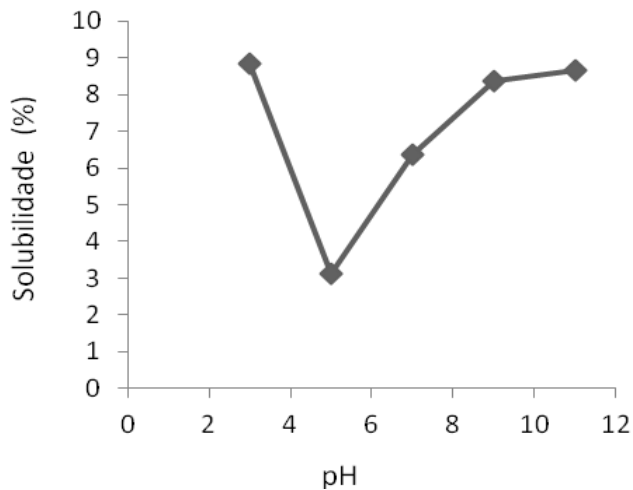
Considerando-se que a matéria-prima apresenta na sua composição 39,5% de proteínas e 54,9% de lipídios, quando comparado com o isolado protéico verifica-se que a proteína é concentrada e que a percentagem de gordura é reduzida, o que conduz a um produto com maior valor agregado para aplicação em alimentos.

Na composição proximal obtida comparada com MORAES (2011), verificou-se que encontrou-se valores aproximados para isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango, 82% de proteína e 4% de lipídios e ROSSI et al (2009) encontraram 61,9% de proteínas e 1,8% de lipídios. Portanto, pode-se observar que foi encontrado no presente estudo valores de proteína próximo e superior, respectivamente, às dos autores citados. Isto gera uma recuperação eficiente no teor de proteína do produto final.

5.2.2 Solubilidade

A Figura 3 apresenta o efeito combinado de pH e solubilidade das proteínas no isolado protéico de frango

Figura 3 - Curva de solubilidade de isolado protéico de frango em pH ácido e alcalino.



A solubilidade das proteínas é o resultado, entre outros fatores, da interação polar com o solvente, interações iônicas com o sal presente na solução e de forças eletrostáticas de repulsão (NEVES, LOURENÇO e SILVA, 2001). Pode-se observar que em valores de pH ácido e alcalino extremos se acarreta aumento da solubilidade.

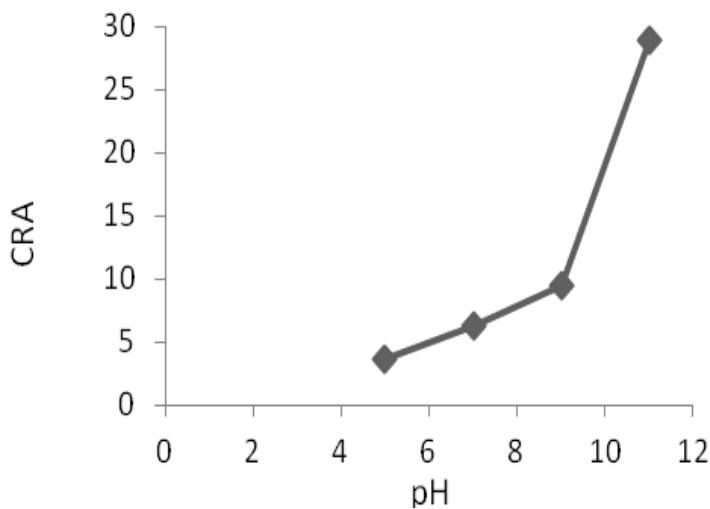
Observou-se uma baixa solubilidade (3%) a pH próximo do ponto isoelétrico da proteína (pH 5) e a maior solubilidade (8,6%) foi atingido em pH extremo de 3,0 e de 11,0. A baixa solubilidade da proteína é causada pela desnaturação da proteína muscular, induzida pelo processo de alteração do pH (RAWDKUEN et al, 2009).

Outros autores obtiveram mesmo tipo de comportamento em estudos de isolados provenientes de diferentes fontes protéicas. COSTA et al (2007), observaram que o isolado protéico de camarão tem solubilidade de 2,8% a pH 4,0, FREITAS et al (2011) encontraram menor solubilidade (2,96%) a pH 5,0 para isolado protéico de anchoita.

5.2.3 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

Os resultados para a capacidade de retenção de água do isolado protéico de CMSF estudados em diferentes pH são mostrados na Figura 4.

Figura 4 - Capacidade de retenção de água de isolado protéico de CMS de frango.



Pode-se observar que a retenção de água, a pH próximo do ponto isoelétrico foi menor, a capacidade foi de 3,66g H₂O / g proteína para isolado protéico em pH de 5,0. Segundo KINSELLA (1987) próximo do ponto isoelétrico da proteína, a capacidade da proteína se ligar com a água é menor, devido às interações intermoleculares e formação de grandes aglomerados de proteína.

As maiores CRA foram obtidas em valores extremos de pH, devido a um pH abaixo de 5,0 e acima de 7,0, as moléculas de água combinam com os grupos polares das proteínas e a CRA tende a aumentar.

A um pH distante do ponto isoelétrico a proteína possui predominância de cargas de mesmo sinal, provocando repulsão e distância entre as moléculas, deixando mais espaço a ser preenchido por moléculas de água, por conseguinte, o aumento da capacidade de retenção de água (KINSELLA, 1987).

A pH 5,0, isolado de semente de goiaba apresentou capacidade de absorção de água de 1,05 g H₂O / g proteína que por sua vez se mostrou baixa, mas aumenta essa capacidade a medida que aumenta o pH (FONTANARI et al, 2007). Concentrados protéicos de corvina apresentaram um decréscimo da capacidade de retenção de água em pH 5,0, sendo de 6g H₂O / g proteína, mas o valor máximo encontrado de 21,9g H₂O / g proteína. (FONTANA et al, 2009). Portanto, podemos verificar que diferentes concentrados protéicos obtiveram a propriedade de encontrar uma capacidade de retenção de água mais baixa em pH 5,0 e aumentar a medida que aumenta o pH.

5.2.4 Capacidade de Retenção de Óleo (CRO)

A capacidade de retenção de óleo apresentada pelo isolado protéico de CMSF foi de 1,96 g de óleo/g proteína. A capacidade de retenção de óleo do isolado protéico está relacionado com a quantidade de lipídios presentes na amostra inicial, neste caso, isolado tem aproximadamente 5% de lipídios.

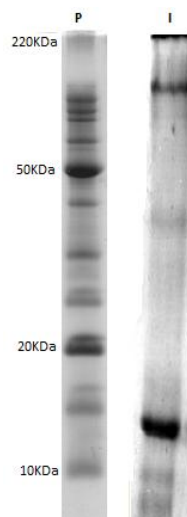
A composição proximal da matéria prima é variável, dos seus constituintes, a gordura merece atenção devido à variação no seu conteúdo, o que se reflete diretamente na estabilidade da emulsão, bem como em processos oxidativos, assim, a importância de conhecer a capacidade de retenção de óleo do produto formado (Terra, 2000).

Concentrados protéicos de corvina apresentaram 4,7 g de óleo/g de proteína. (FONTANA et al, 2009). A retenção de óleo também varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos da proteína e, provavelmente, as cadeias laterais não polares das proteínas têm afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de óleo, contribuindo para a absorção e melhora da CRO (DONADEL & PRUDENCIO-FERREIRA, 1999).

5.2.5 Eletroforese

Os resultados das análises de eletroforese do isolado protéico de frango estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Eletroforetograma da amostra de isolado protéico de frango.



P- padrão, I – isolado protéico.

Os resultados das análises de eletroforese permitem a observação das diversas frações protéicas presentes nas amostras. Estas se caracterizam por cadeias de miosina pelo alto peso molecular (50kDa a 220KDa), actina (20KDa) e cadeias leves de miosina (10KDa).

Entre as frações proteicas presentes, foram identificadas proteínas miofibrilares, actina e miosina comparadas ao padrão molecular. Foram identificadas proteínas de alto peso molecular de miosina e actina e uma banda de proteínas com peso menor que 20KDa.

O número e intensidade de bandas correspondentes a fragmentos de miosina de alto peso molecular se devem à preservação das proteínas miofibrilares, tendo em vista que o isolado protéico obtido possui um percentual de proteínas de 80%, pode-se confirmar a qualidade destas proteínas através deste resultado do eletroforetograma.

5.3 Desenvolvimento dos filmes

Foram realizados testes preliminares com variação na temperatura de aquecimento da solução filmogênica. Foram testadas as temperaturas de 70, 80 e 90 °C. Essas temperaturas foram definidas através da literatura, onde para elaboração de filme de gelatina utilizaram temperatura de solubilização a 70 °C (DAVANÇO, TANADA-PALMU e GROSSO, 2007), filmes comestíveis a base de proteínas miofibrilares de carne bovina foram submetidos a tratamento térmico a temperatura de 75 °C (SOUZA, SOBRAL & MENEGALLI, 2012), e filmes produzidos com isolado protéico de pescado foram tratados a temperatura de 80 °C (CORTEZ-VEGA et al, 2013).

A melhor temperatura para o processo de formação do filme foi definida através de análises de caracterização do filme como resistência à tração e alongação; cor e opacidade; e solubilidade. As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados obtidos a partir dessas avaliações.

Tabela 4 - Resistência à tração, alongação e solubilidade de filmes de isolado protéico de frango obtidas em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Resistência à tração (MPa)*	Elongação (%)*	Solubilidade (%)*
70	6,2 ^a ± 0,1	6,2 ^a ± 0,1	36,7 ^c ± 0,6
80	5,2 ^b ± 0,2	4,4 ^b ± 0,2	44,2 ^a ± 0,6
90	2,6 ^c ± 0,2	5,4 ^c ± 0,2	40,8 ^b ± 0,8

*Média dos resultados da triplicata ± desvio padrão

Considerando as temperaturas de 70, 80 e 90 °C, podemos verificar que houve diferença significativa para as análises de resistência a tração e alongação e solubilidade dos filmes. A formação dos filmes e suas características envolvem 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).

O filme a 70 °C apresentou um valor maior (6,2MPa) de resistência a tração e alongação (6,2%) e um valor menor (36,7%) de solubilidade. Isso resulta em um filme em melhores condições, visando que é importante ter uma boa estrutura do polímero, pois segundo ZAVAREZE et al (2012) os filmes devem ter uma resistência mecânica para garantir a integridade dos mesmos quando utilizados como embalagem e a menor solubilidade serve para proteger alimentos em seu armazenamento (SILVA, 2011).

Tabela 5 - Cor e opacidade de filmes de isolado protéico de frango obtidos em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Cor			Opacidade*
	L*	a*	b*	
70	72,8 ^a ± 0,6	2,7 ^b ± 0,8	42,8 ^a ± 0,4	19,4 ^a ± 0,8
80	73,6 ^a ± 0,2	3,1 ^b ± 0,6	42,5 ^a ± 0,2	20,3 ^a ± 0,6
90	68,8 ^b ± 0,8	5,1 ^a ± 0,4	41,4 ^a ± 0,5	20,5 ^a ± 0,7

*Média dos resultados da triplicata ± desvio padrão

Quanto a opacidade não se teve diferença significativa, e para a cor apenas os parâmetros L* e a* na temperatura de 90 °C diferiram das demais, sendo que L* representa o quanto uma amostra é clara ou escura (luminosidade) e varia em escala de 0 (preto) a 100 (branco), a* intensidade do vermelho e b* intensidade do amarelo (DURÁN et al, 2012). Pode-se concluir que o filme a 90 °C apresentou-se mais opaco e tendeu a coloração mais avermelhado do que amarelado. A 70 °C se apresenta um filme com menor opacidade, ZAVAREZE et al (2012) afirmam que é importante que os filmes apresentem baixa opacidade, ou seja, maior transparência a fim de poder se observar melhor o produto embalado. A luminosidade (L*) e coloração mais amarelada (b*) conferem uma coloração mais próxima à cor de embalagens usuais.

Diante destes resultados, pode-se começar o planejamento experimental de filmes de carne mecanicamente separada de frango, sendo estes filmes elaborados com solução filmogênica a 70 °C.

5.4 Avaliação das propriedades dos filmes com montmorilonita

5.4.1 Espessura física

Na Tabela 6 estão apresentados os valores obtidos de espessura, com a quantidade de solução filmogênica colocada na placa e a média.

Tabela 6 - Determinação da espessura dos filmes de isolado de frango e nanoargilas

	Quantidade de solução filmogênica (g)	Espessura (mm)
	15,0	0,19
	14,5	0,18
	15,5	0,20
	17,0	0,22
	16,0	0,21
Média	15,6	0,20

A espessura foi fixada com a média aritmética de cinco medidas aleatórias sobre a área do filme, verificou-se que com aumento de sólidos conseqüentemente havia um aumento da espessura, mesmo comportamento encontrado por BRANDELERO, GROSSMANN e YAMASHITA, (2013) que determinaram espessuras de filmes de amido da mesma maneira e obteve variação de espessura de 0,11 mm a 0,33 mm. CORTEZ-VEGA et al (2013) também determinou espessura de filmes de isolado protéico de corvina através da média de 10 medidas de espessura. Portanto, este valor da média de espessuras (0,2mm) foi mantido para o planejamento, conforme a quantidade de solução colocada na placa (15,5g), já que estes apresentaram melhores características de resistência à tração e alongação, a partir de testes preliminares.

5.4.2 Propriedades físico-químicas

Foram obtidas superfícies de respostas para avaliar o efeito das variáveis independentes, isolado protéico de frango (IPF), montmorilonita (MMT) e glicerol (G) nas

variáveis dependentes (resistência a tração, alongação, opacidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água).

A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento experimental e os resultados obtidos para os ensaios mecânicos de tração e alongação. Os pontos centrais para as duas respostas apresentaram variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental utilizado para avaliação das propriedades mecânicas de filmes de isolado protéico de frango e nanoargilas

Variáveis independentes				Propriedades	
Ensaio	IP (g/100mL)	MMT (g/100mL)	Glicerol (g/100mL)	Resistência Tração* (MPa)	Elongação* (%)
1	-1(2,0)	-1 (0,3)	-1 (0,5)	8,6 ± 0,11	41 ± 0,06
2	+1 (5,0)	-1 (0,3)	-1 (0,5)	8,6 ± 0,15	44 ± 0,11
3	-1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (1,5)	7,6 ± 0,20	26 ± 0,16
4	+1 (5,0)	-1 (0,3)	+1 (1,5)	7,6 ± 0,13	29 ± 0,13
5	-1 (2,0)	+1 (0,7)	-1 (0,5)	7,5 ± 0,18	36 ± 0,17
6	+1 (5,0)	+1 (0,7)	-1 (0,5)	6,7 ± 0,23	66 ± 0,22
7	-1 (2,0)	+1 (0,7)	+1 (1,5)	6,8 ± 0,26	28 ± 0,04
8	+1 (5,0)	+1 (0,7)	+1 (1,5)	8,4 ± 0,11	36 ± 0,12
9	-1,68 (1,0)	0 (0,5)	0 (1,0)	8,4 ± 0,22	44 ± 0,05
10	+1,68 (6,0)	0 (0,5)	0 (1,0)	7,4 ± 0,24	46 ± 0,13
11	0 (3,5)	0 (0,5)	-1,68 (0,2)	7,9 ± 0,19	56 ± 0,16
12	0 (3,5)	0 (0,5)	+1,68 (1,8)	7,0 ± 0,13	35 ± 0,26
13	0 (3,5)	-1,68 (0,2)	0 (1,0)	9,1 ± 0,12	52 ± 0,11
14	0 (3,5)	+1,68 (0,8)	0 (1,0)	8,9 ± 0,11	40 ± 0,10
15	0 (3,5)	0 (0,5)	0 (1,0)	7,8 ± 0,22	39 ± 0,05
16	0 (3,5)	0 (0,5)	0 (1,0)	8,0 ± 0,02	39 ± 0,01
17	0 (3,5)	0 (0,5)	0 (1,0)	8,0 ± 0,09	39 ± 0,07

*Valores médios obtidos de 3 repetições expressos como média ± desvio padrão

IPF: Isolado protéico de frango, MMT: Montmorilonita.

Conforme as condições do processo, a tração dos filmes de isolado protéico de frango com montmorilonita variou de 6,7 a 9,1MPa, e a alongação de 26 a 66%. ZAVAREZE et al (2012) encontraram em filmes a base de proteína miofibrilar de peixe RT que variou de 4,0 a 5,7MPa e alongação de 102 a 193%, CORTEZ-VEGA et al (2013) em filmes de isolado proteico de corvina com adição de montmorilonita encontraram RT 7,2 a 10,7MPa e alongação de 39,6 a 45, 8%, Podemos verificar então que o filme obtido neste trabalho apresentou uma resistência razoável em relação aos outros filmes, possivelmente devida a adição da montmorilonita, inclusive obtendo valores próximos a CORTEZ-VEGA et al (2013) que também usaram essa nanoargila e quanto a alongação obteve-se uma variabilidade maior que outros autores.

A Tabela 8 apresenta o coeficiente de regressão para a variável resistência a tração (RT), já considerando as variáveis significativas ($p > 0,05$).

Tabela 8 - Coeficiente de regressão para a variável resistência a tração de filmes de isolado proteico de frango e nanoargilas

Variável		Coeficiente	p*
	Constante	5,30	0,01
Linear	MMT	-0,73	0,01
Quadrática	MMT	24,4	0,01
	G	-13,49	0,03
Interação	IP x G	0,69	0,00
	G x MMT	0,28	0,04

* $p \leq 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança.

A equação a seguir descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, que contem apenas os termos significativos.

$$RT = 5,30 - 0,73MMT + 24,4MMT^2 - 13,49G^2$$

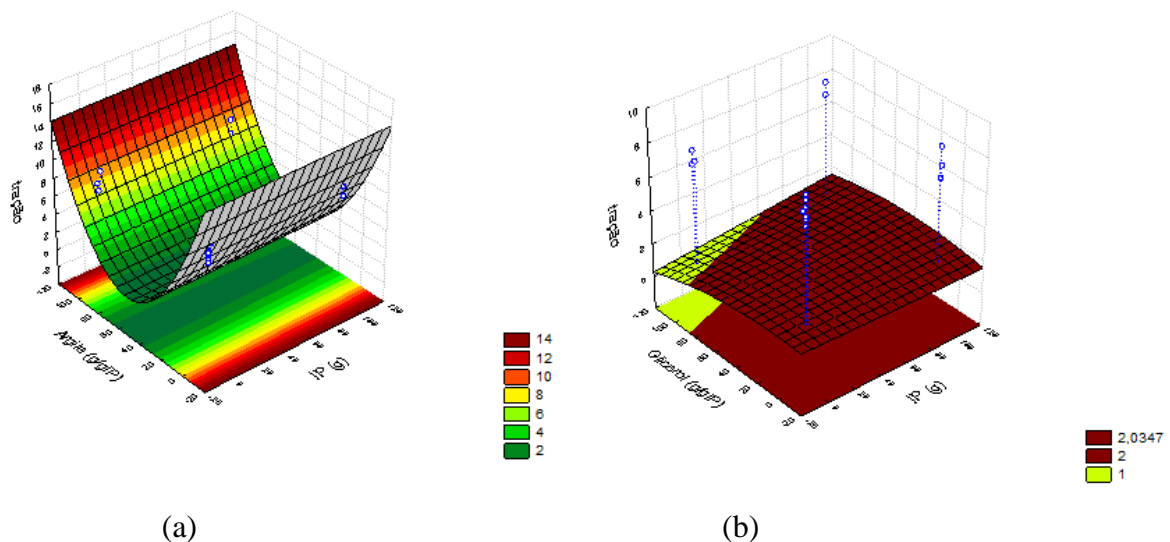
Com a finalidade de testar se o modelo é preditivo, foi realizada análise de variância (ANOVA) apresentado na Tabela 9. Segundo INMETRO (2007), quando $F_{\text{calculado}}$ é superior que F_{tabelado} , o modelo é preditivo, ou seja as variáveis influenciam no processo.

Tabela 9 - Verificação da validade estatística do modelo para resistência a tração

	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	71,029	5	14,20588	44,14	2,94
Resíduo	3,540	11	0,3218		
Falta Ajuste	3,460008	9	0,384445		
Erro	0,080000	2	0,040000		
Total	74,5694	16			

Onde: SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Quadrado Médio; F:Fisher

Diante disso, é possível visualizar as condições de resistência a tração em função das concentrações de isolado protéico, montmorilonita e glicerol na Figura 6a e 6b e concluir que a resistência a tração se torna maior com quantidades máximas (0,8g) e mínimas (0,2g) de MMT, quantidade menores de glicerol, independente da quantidade de isolado protéico.

Figura 6 - Superfície de resposta da resistência a tração em função da concentração de (a) isolado protéico e MMT (b) isolado protéico e Glicerol

Para a variável alongação, o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que F_{tabelado} , portanto o modelo não foi preditivo, não sendo possível gerar a superfície de resposta. Portanto, a alongação não foi influenciada pelas variáveis do processo (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento experimental e os resultados obtidos para as variáveis dependentes opacidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA), sendo que para a PVA o $F_{\text{calculado}}$ não foi maior que F_{tabelado} , sendo assim não é um modelo preditivo, não sendo influenciada pelas variáveis do processo (RODRIGUES e LEMMA, 2009). Porém, a opacidade e a solubilidade obtiveram $F_{\text{calculado}}$ superior ao F_{tabelado} , sendo desta forma influenciadas pelas variáveis do processo.

Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental utilizado para avaliação da opacidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água de filmes de isolado protéico de frango e nanoargilas

Variáveis independentes				Propriedades		
Ensaio	IP (g/100mL)	MMT (g/100mL)	Glicerol (g/100mL)	Opacidade*	Solubilidade* (%)	PVA* (g.mm/m ² .d .kPa)
1	-1(2,0)	-1 (0,3)	-1 (0,5)	13,7 ± 0,32	46,5 ± 0,74	1,74 ± 0,68
2	+1 (5,0)	-1 (0,3)	-1 (0,5)	18,6 ± 0,53	39,7 ± 0,6	1,23 ± 0,18
3	-1 (2,0)	-1 (0,3)	+1 (1,5)	13,1 ± 0,52	53,1 ± 0,54	1,21 ± 0,01
4	+1 (5,0)	-1 (0,3)	+1 (1,5)	16,0 ± 0,18	53,6 ± 0,25	1,3 ± 0,15
5	-1 (2,0)	+1 (0,7)	-1 (0,5)	14,8 ± 0,82	38,5 ± 0,09	1,23 ± 0,40
6	+1 (5,0)	+1 (0,7)	-1 (0,5)	35,7 ± 0,07	71,8 ± 0,34	1,64 ± 0,01
7	-1 (2,0)	+1 (0,7)	+1 (1,5)	15,3 ± 1,06	48,4 ± 0,05	2,83 ± 0,11
8	+1 (5,0)	+1 (0,7)	+1 (1,5)	16,5 ± 0,49	54,0 ± 0,24	1,04 ± 0,25
9	-1,68 (1,0)	0 (0,5)	0 (1,0)	15,2 ± 0,50	81,8 ± 0,78	2,01 ± 0,31
10	+1,68 (6,0)	0 (0,5)	0 (1,0)	20,0 ± 0,36	46,5 ± 0,09	1,51 ± 0,09
11	0 (3,5)	0 (0,5)	-1,68 (0,2)	17,6 ± 0,83	38,6 ± 0,13	1,33 ± 0,09
12	0 (3,5)	0 (0,5)	+1,68 (1,8)	14,7 ± 0,41	43,6 ± 0,22	1,74 ± 0,44
13	0 (3,5)	-1,68 (0,2)	0 (1,0)	13,5 ± 0,59	42,2 ± 0,20	1,00 ± 0,01
14	0 (3,5)	+1,68 (0,8)	0 (1,0)	17,8 ± 0,89	40,7 ± 1,10	1,76 ± 0,33
15	0 (3,5)	0 (0,5)	0 (1,0)	14,7 ± 0,59	40,9 ± 0,37	1,09 ± 0,03
16	0 (3,5)	0 (0,5)	0 (1,0)	16,5 ± 0,29	45,7 ± 0,06	1,08 ± 0,01
17	0 (3,5)	0 (0,5)	0 (1,0)	16,0 ± 0,33	45,8 ± 0,26	1,07 ± 0,03

*Valores médios obtidos de 3 repetições expressos como média ± desvio padrão

IPF: Isolado protéico de CMSF, MMT: Montmorilonita; PVA: Permeabilidade ao vapor de água.

Conforme as condições do processo, a opacidade variou de 13,1 a 35,7 e a solubilidade de 38,5% a 81,8%. NASCIMENTO et al (2013) em filmes de quitosana com adição de argila encontraram opacidade de 14,0 a 31,9, resultado dentro da faixa de valores encontrados neste trabalho. CORTEZ-VEGA et al (2013) em filmes de isolado protéico de corvina com adição de montmorilonita encontraram opacidade de 12 a 13,5 e solubilidade de 18,1% a 27,6%. Com isso pode-se concluir que os filmes deste trabalho apresentaram maior opacidade e solubilidade e com maior variabilidade diante dos demais trabalhos. ZAVAREZE et al (2012) afirmam que é importante que os filmes apresentem baixa opacidade, ou seja, maior transparência, para visualização do produto embalado e afirma que é melhor que filmes apresentem menor solubilidade para proteger o alimento e garantir a qualidade no armazenamento.

Na Tabela 11 apresenta o coeficiente de regressão para a variável Opacidade, já considerando as variáveis significativas ($p > 0,05$).

Tabela 11 - Coeficiente de regressão para a variável opacidade de filmes de isolado protéico de frango e nanoargilas.

Variável		Coeficiente	p*
	Constante	48,69	0,01
Linear	IP	6,94	0,00
	Glicerol	-7,22	0,01
	MMT	6,04	0,01
Interação	IP x G	-4,24	0,01
	I x MMT	4,34	0,01
	G x MMT	-2,72	0,03

* $p \leq 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança.

A equação a seguir descreve a opacidade prevista pelo modelo em função das variáveis codificadas, que contem apenas os termos significativos.

$$\text{Opacidade} = 48,69 + 6,94\text{IP} - 7,22\text{G} + 6,04\text{MMT}$$

A Tabela 12 apresenta os valores de F calculado e F tabelado, com a finalidade de testar a se o modelo é preditivo. Conclui-se que o modelo é preditivo e pode-se gerar a superfície de resposta para a variável opacidade.

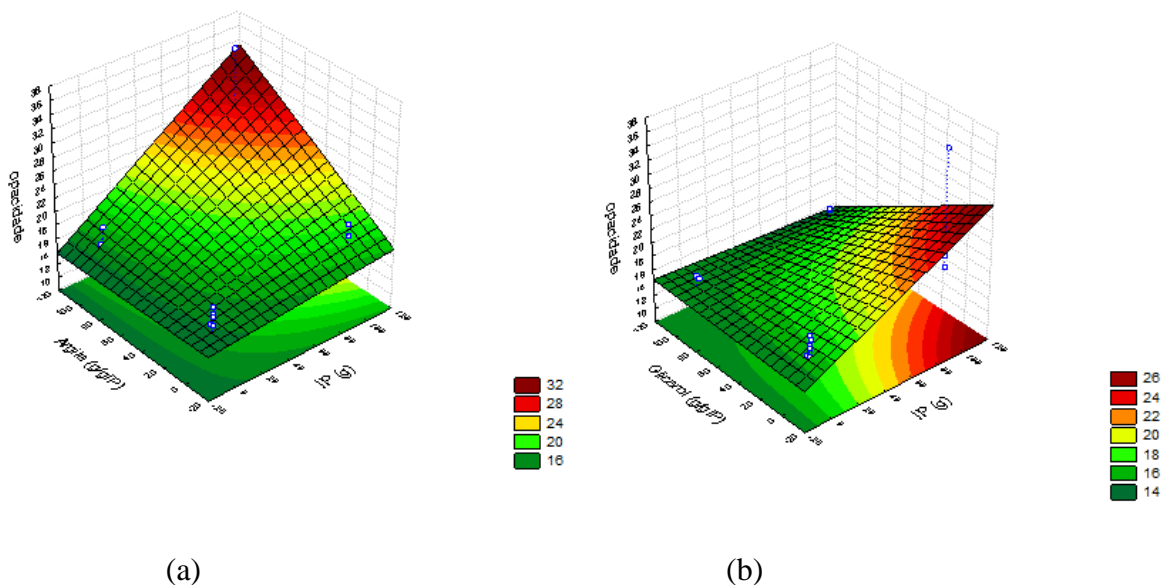
Tabela 12 - Verificação da validade estatística do modelo para opacidade

	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	358,109	6	59,68	8,96	4,05
Resíduo	66,629	10	6,6629		
Falta Ajuste	64,98	8	8,1235		
Erro	1,64	2	0,820300		
Total	424,7382	16			

Onde: SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Quadrado Médio; F:Fisher

As Figuras 7a e 7b apresenta a superfícies de resposta da opacidade frente as concentrações de isolado protéico de frango, glicerol e montomorilonita.

Figura 7 - Superfície de resposta da opacidade em função da concentração de (a) isolado protéico e MMT (b) isolado protéico e Glicerol.



Diante disso, foi possível visualizar as condições de opacidade em função das concentrações de isolado protéico, montmorilonita e glicerol na Figura 7a e 7b e concluir que a menor opacidade (13,7) se torna com quantidades maiores de MMT (0,8g), quantidade menores de Glicerol (0,2g), e quantidade maior de isolado protéico (6g). Esse comportamento foi diferente ao encontrado por TAVARES (2010) e NASCIMENTO et al (2013), pois segundo eles o aumento da opacidade se dá com o aumento de argila. Nesse caso pode ser devido à boa diluição da montmorilonita junto aos outros componentes do filme.

A Tabela 13 apresenta o coeficiente de regressão para a variável solubilidade, já considerando as variáveis significativas ($p > 0,05$).

Tabela 13 - Coeficiente de regressão para a variável solubilidade de filmes de isolado proteico de frango e nanoargilas.

Variável		Coeficiente	p*
	Constante	-172,92	0,07
Linear	MMT	7,07	0,09
Quadrática	IP	730,95	0,00
Interação	I x MMT	4,34	0,01
	G x MMT	-2,72	0,03

* $p \leq 0,1$ indica variável significativa a 90% de confiança.

A equação a seguir descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, que contem os termos significativos.

$$\text{Solubilidade} = -172,92 + 7,07\text{MMT} + 730,95\text{IP}^2$$

A Tabela 14 apresenta os valores de F calculado e F tabelado, com a finalidade de testar a adequacidade do modelo. Conclui-se que o modelo é preditivo e pode-se gerar a superfície de resposta para a variável solubilidade.

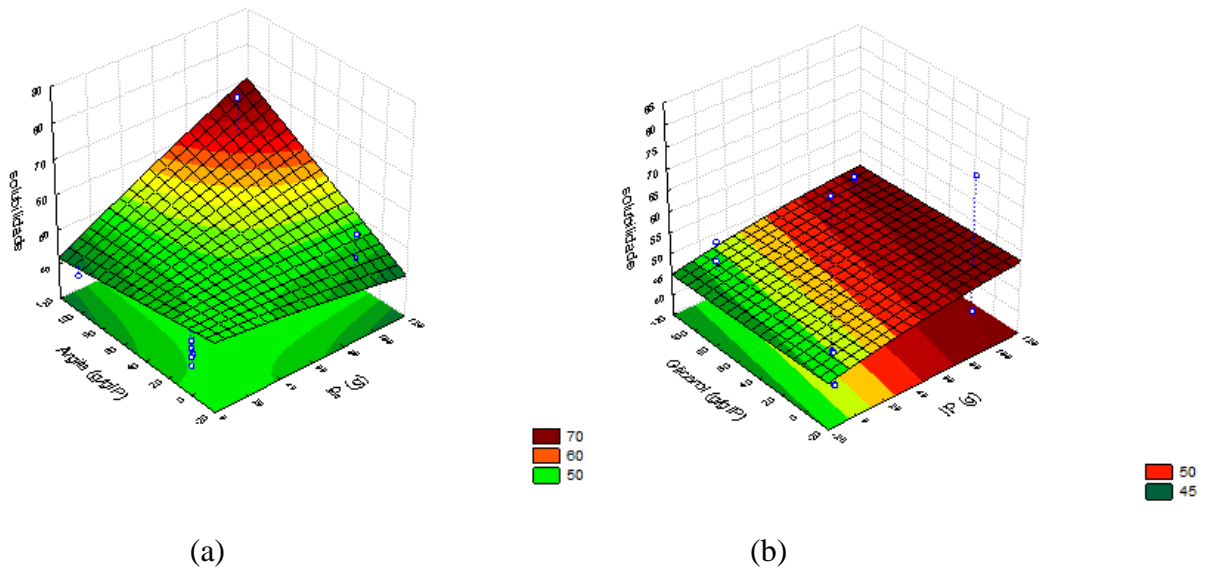
Tabela 14 - Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade

	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	1371,557	4	342,88917	4,92	3,9
Resíduo	834,834	12	69,5695		
Falta Ajuste	819,21329	10	81,9213299		
Erro	15,620267	2	7,810133		
Total	2206,3902	16			

Onde: SQ: Soma Quadrática; GL: Graus de Liberdade; MQ: Quadrado Médio; F:Fisher

As Figuras 8a e 8b apresenta a superfícies de resposta da solubilidade frente as concentrações de isolado protéico de frango, glicerol e montomorilonita.

Figura 8 - Superfície de resposta da solubilidade em função da concentração de (a) isolado protéico e MMT (b) isolado protéico e Glicerol.



Diante disso, é possível visualizar as condições de solubilidade em função das concentrações de isolado protéico, montmorilonita e glicerol na Figura 8a e 8b e concluir que a menor solubilidade (13,7%) se torna com quantidades maiores de MMT (0,8g), independente da quantidade de Glicerol, e quantidade menor de isolado protéico (1g). Apresentou mesmo comportamento que NASCIMENTO (2013), onde a solubilidade foi menor quando as concentrações de quitosana foram menores e com a adição de argila.

A partir das superfícies de resposta se escolheu a melhor formulação para o preparo do filme para as posteriores análises. Diante da interpretação dos resultados da superfície de resposta o filme com melhores propriedades seriam aqueles com quantidade máxima de MMT (0,8 g / 100 mL), menor quantidade de glicerol (0,2 g/ 100 mL), visto que sua quantidade não influenciou muito nas propriedades, e quantidade intermediária de isolado (2 g/ 100 mL) para não tornar o filme opaco.

5.4.3 Propriedades Estruturais

O filme com melhor formulação determinado a partir do planejamento foi caracterizado quanto suas propriedades estruturais.

5.4.3.1 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As Figuras 9 e 10 apresentam os espectros no infravermelho de filmes com e sem incorporação de montmorilonita (MMT).

Figura 9 – Espectroscopia no infravermelho de filmes de isolado protéico de frango sem montmorilonita.

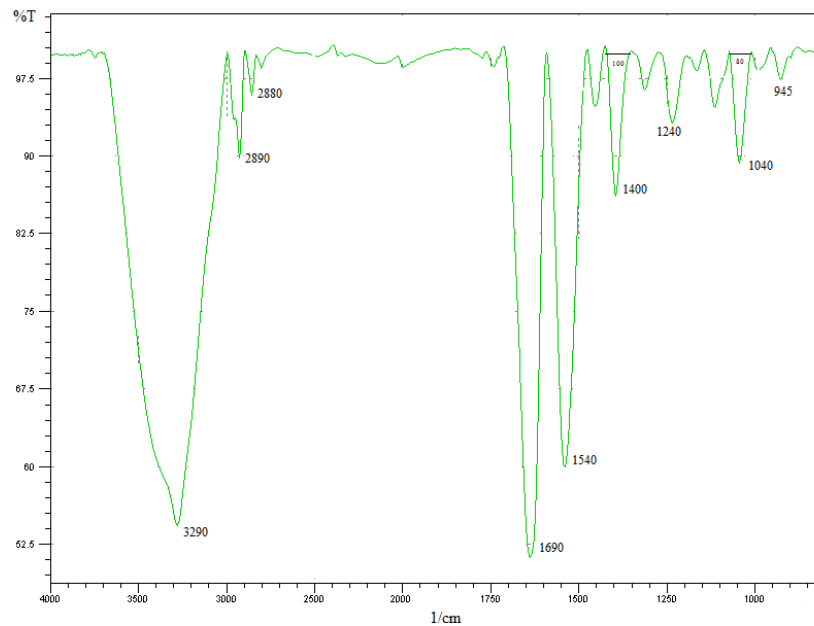
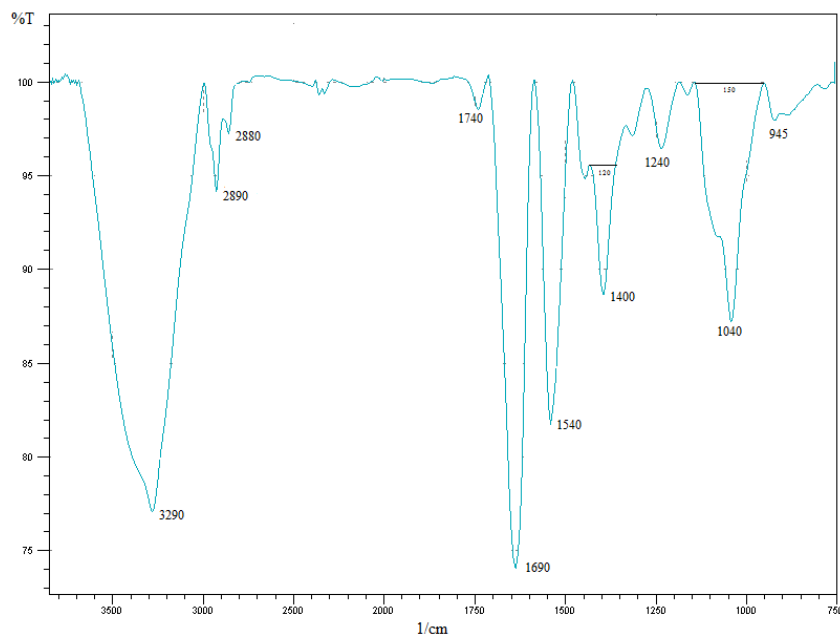


Figura 10 - Espectroscopia no infravermelho de filmes de isolado protéico de frango com montmorilonita.



Os espectros mostram um aumento na largura das bandas de 50cm^{-1} com incorporação de MMT, podemos verificar os picos em mesmos comprimentos de ondas em ambos filmes, porém o número de ondas com MMT devido ao alargamento em alguns casos parece ser levemente menor, como no caso da região de $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$. Isso é bem possível de

acontecer devido à interação da cadeia dos componentes do filme com a MMT através de pontes de hidrogênio (SLAVUTSKY et al, 2014).

Picos em torno de 2800 a 2900 cm^{-1} podem ser associadas aos estiramentos assimétricos e simétricos das ligações C-H (dos grupos CH_3 e CH_2). Pode-se verificar que estão mais ampliados em filmes com adição de montmorilonita, SANTOS (2011) estudou efeitos de diferentes argilas e verificou que todas havia este grupo funcional, pois apresentavam picos nesta banda de aproximadamente 2800 cm^{-1} .

A Figura 10 apresenta bandas na região de 3600-3400 cm^{-1} , correspondentes à vibração de estiramento (axial) do grupo hidroxila referente à água adsorvida entre as lamelas da MMT. As bandas características das ligações Si-O-Si foram observadas na região entre 1150-1020 cm^{-1} , e na faixa de 945-810 cm^{-1} , correspondentes às camadas octaédricas do alumino-silicato Si-O-Al (DELPECH et al, 2011).

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).

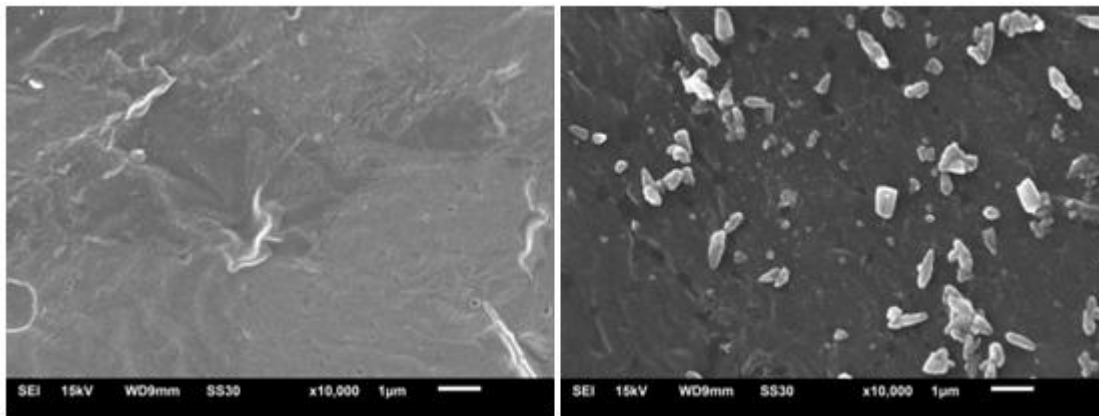
Portanto, através da análise espectroscópica, pôde-se observar as principais características estruturais dos filmes elaborados e as interações entre o isolado protéico e a montmorilonita. Estes resultados sugerem que houve uma interação entre o IPF e MMT, as amplitudes dos picos de filme com MMT foram maiores, apesar de ambos os filmes apresentarem picos semelhantes.

5.4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figuras 11a e 11b apresenta as microscopias eletrônica de varredura para os filmes de isolado proteico de frango sem e com incorporação de montmorilonita, respectivamente. E a Figura 12 apresenta a microscopia da MMT natural, segundo SARRIER et al (2010).

Microscopia eletrônica de varredura pode ser usada para avaliar a homogeneidade dos filmes, a estrutura da camada, poros, rachaduras e lisura de superfície (BILBAO-SAINZ et al, 2010).

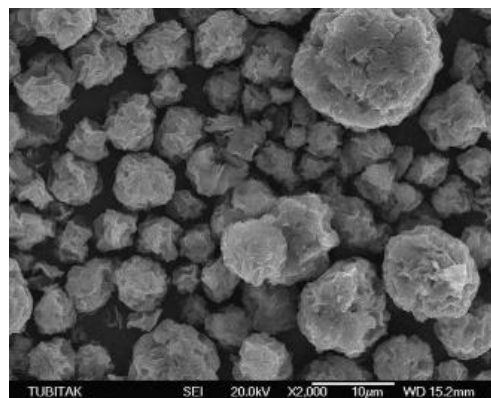
Figura 11 - MEV de filmes de isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango (a) sem adição de montmorilonita (b) com adição de montmorilonita



(a)

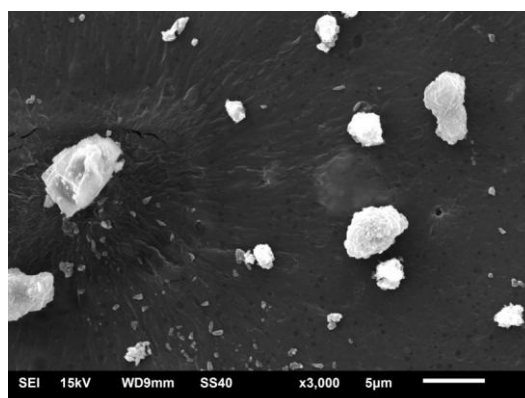
(b)

Figura 12 - MEV da montmorilonita natural (MMT-Na), com aumento de 2000x.



Fonte: SARRIER et al, 2010.

Figura 13 - MEV de filmes de isolado protéico de carne mecanicamente separada de frango com adição de montmorilonita com aumento de 3000x



Na microscopia eletrônica de varredura com aumento de 10000 vezes, apresentada na Figura 11 pode-se notar a diferença na morfologia dos filmes. Na Figura 11a notamos uma estrutura compacta e homogênea, o que demonstra a interação da proteína com o plastificante, diferente da Figura 11b que na presença de MMT apresenta em sua estrutura grânulos, o que representa aglomerados da nanoargila MMT.

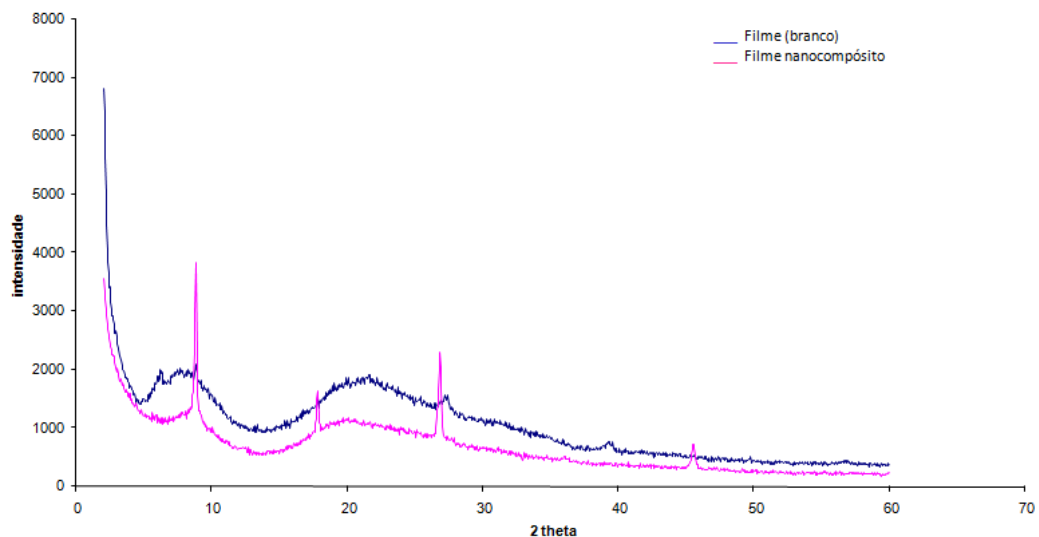
A micrografia 13 mostra partículas em formato de grânulos não uniformes, pequenas e bem separadas em diferentes partes, porém estas não se apresentam em forma de esferas, que segundo SARRIER et al (2010), é o formato da MMT natural (Figura 12). Estas mudanças estão diretamente relacionadas à intercalação e adsorção da proteína e plastificantes com a montmorilonita.

Estas discontinuidades, na estrutura do filme, poderiam proporcionar a formação de vias preferenciais para difusão do vapor de água, o que explicaria a maior permeabilidade ao vapor de água (PVA) do filme (BODINI, 2011), porém neste caso não houve influencia da MMT na PVA dos filmes.

5.4.3.3 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas dos filmes a base de isolado protéico de CMSF estão apresentados na Figura 14. É possível observar que os espectros são diferentes, sugerindo a presença de estruturas distintas nas diferentes camadas do filme.

Figura 14 - DRX de filmes de isolado protéico de CMSF sem montmorilonita (branco) e com montmorilonita (filme ativo).



Pode-se notar que o filme nanocompósito com a presença de MMT apresenta picos, que representam fases cristalinas segundo JESUS e MACEDO (2010), em que o filme sem MMT não apresenta. Isso se deve ao fato de que quando a irradiação incide a camada superficial do filme com montmorilonita possui um reflexo da irradiação incidida, representando um filme amorfo, provavelmente devido a sua composição, este potencial depende fortemente do substrato. MOURA et al (2009) também analisaram DRX em filmes finos calcogênios e observaram que os filmes são majoritariamente amorfos, apresentando indícios de oxidação. Essa oxidação não é vantajosa, pois caso o filme seja oxidado, há grande indício de oxidar o produto embalado também.

O pequeno pico próximo a 20° no filme ativo nanocompósito com MMT é característico da fase cristalina de polímeros (PATTABI, AMMA e MANZoor, 2007). E os demais picos entre 20 e 40° e 40 e 60° segundo FERNANDES et al (2009) correspondem a reflexão de estruturas de minerais podendo ser zinco ou ferro que são mais evidentes em filmes nanocompósitos devido a composição da montmorilonita.

Segundo SLAVUTSKY et al (2014) em sua amostra sem MMT também não obteve picos, indicando que não apresentou indicativo de estrutura cristalina.

5.4.3.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Figura 15 e 16 apresentam as curvas de calorimetria diferencial de varredura para os filmes de isolado proteico de frango sem e com incorporação de montmorilonita, respectivamente.

Figura 15 - DSC de filmes de isolado protéico de frango sem montmorilonita

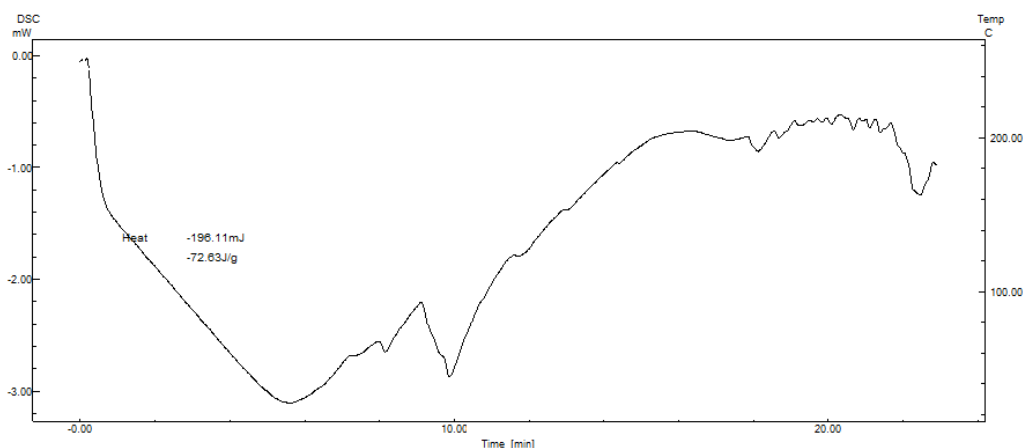
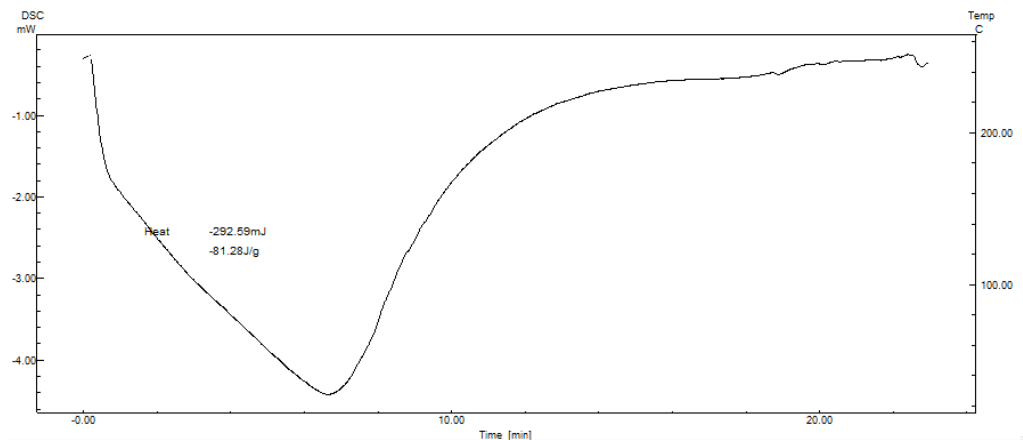


Figura 16 - DSC de filmes de isolado protéico de frango com montmorilonita



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 do isolado protéico de frango foi observado em 20 °C.

Estes gráficos permitem observar as transições de fase do material. Podemos verificar primeiramente que a partir de 5 min uma reação começa ocorrer, devido o abaixamento de temperatura, gerando um pico que pode ser observado nas figuras 15 e 16, de uma reação exotérmica, ou seja, ao longo do tempo houve liberação de calor.

A liberação de calor no filme controle foi $\Delta H = -72,63 \text{ J.g}^{-1}$ e no filme com montmorilonita $\Delta H = -81,28 \text{ J.g}^{-1}$ em solubilização alcalina em pH 11,0. Segundo LEE et al (2007) 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). Segundo WANG et al (1999) quando ΔH apresenta valores próximos à zero, indica que as proteínas estão completamente desnaturadas, nesse caso podemos dizer que o IPF foi desnaturado devido ao valor de ΔH ter dado abaixo de zero.

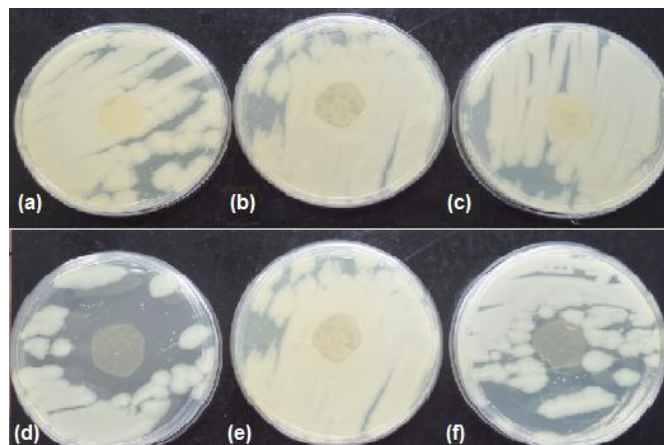
A partir da Figura 15 e Figura 16 pode-se verificar que com a adição da montmorilonita a curva se manteve com menos variações, esses dados sugerem que houve uma estabilidade térmica maior neste filme.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes com montmorilonita e óleo essencial de orégano

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes realizada pelo método de disco difusão, com e sem incorporação de montmorilonita e óleo de orégano estão apresentados na Figura 17 e 18.

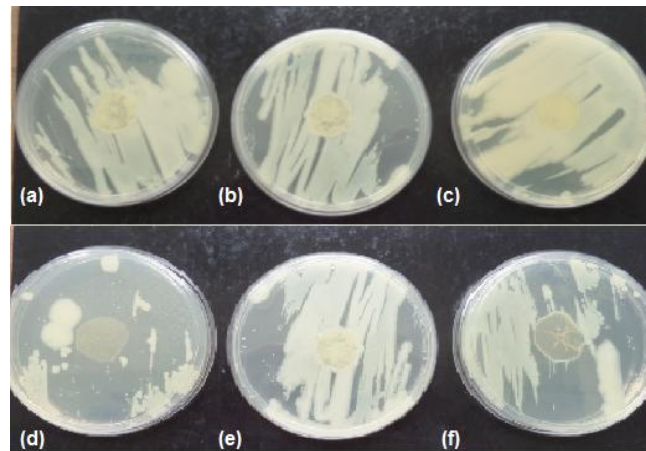
Após a multiplicação dos micro-organismos, observou-se que os discos de filme com montmorilonita e óleo essencial de orégano em diferentes concentrações não foi capaz de formar halo inibitório devido ao desenvolvimento microbiano não ter sido uniforme em torno de toda a placa, mas foi possível ver diferença na inibição entre os diferentes antimicrobianos.

Figura 17 - Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de frango com e sem incorporação de agentes antimicrobianos frente a *Listeria monocytogenes* J11.



(a) inibição pelo filme incorporado com 1,2 % de montmorilonita; (b) inibição pelo filme sem incorporação de agente antimicrobiano; (c) inibição pelo filme incorporado com 0,8 % de montmorilonita; (d) inibição pelo filme incorporado com 1,2 % de óleo de orégano (e) inibição pelo filme sem incorporação de agente antimicrobiano (f) inibição pelo filme incorporado com 0,8% de óleo de orégano.

Figura 18 - Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de frango com e sem incorporação de agentes antimicrobianos frente a *Salmonella* Enteritidis.



(a) inibição pelo filme incorporado com 1,2 % de montmorilonita; (b) inibição pelo filme sem incorporação de agente antimicrobiano; (c) inibição pelo filme incorporado com 0,8 % de montmorilonita; (d) inibição pelo filme incorporado com 1,2 % de óleo de óregano (e) inibição pelo filme sem incorporação de agente antimicrobiano (f) inibição pelo filme incorporado com 0,8% de óleo de óregano.

Os filmes com montmorilonita (17a;17c;18a;18c) nessa matriz polimérica não possuiu atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*, em ambas concentrações de solução.

CORTEZ-VEGA et al (2013), encontraram inibição de micro-organismos psicrotróficos, bolores e leveduras com adição desta em uma matriz de isolado protéico de corvina, porém é importante lembrar que segundo PINHEIRO et al (2010), a funcionalidade e o comportamento dos filmes dependem principalmente das suas propriedades mecânicas e de transporte, que por sua vez dependem da composição do filme, do seu processo de formação e do método de aplicação no produto.

Porém os filmes com óleo essencial de orégano (17d;17f;18d;18f) apresentaram inibição, sendo que em torno do filme e até sobre ele não houve multiplicação de ambos micro-organismos, diferente do comportamento de filmes com montmorilonita. Além disso, pode-se verificar que filmes com 1,2% de óleo que apresentaram inibição eficiente.

O óleo essencial de orégano já possui sua atividade antimicrobiana comprovada por outros autores, Carvacrol , timol , c – terpineol e p – cimeno são os constituintes mais ativos do óleo de óregano, gerando o amplo espectro de propriedade antimicrobiana (BURT, 2004; LAMBERT ET AL, 2001; ROCHA-GUZMAN et al, 2007).

Os resultados obtidos também demonstraram que os filmes controle (17b; 17e; 18b; 18e) não promoveram inibição na multiplicação dos micro-organismos testados. Segundo

PÉREZ et al (2011) filmes controles, sem adição de antimicrobianos, não apresentaram efeito inibitório em qualquer micro-organismo testado.

A adição de agentes antimicrobianos e o método de formação de filmes pode alterar as propriedades mecânicas de filmes, as propriedades antimicrobianas e físicas de filmes de proteína devido ao comportamento destes com os vários agentes antimicrobianos (SAYANJALI, GHANBARZADEH e GHIASSIFAR, 2011). Outros fatores podem interferir nos resultados antimicrobianos obtidos através de métodos de difusão e diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados (RÍOS e RECIO, 2005).

Portanto, pode-se dizer que neste caso a difusão do filme, ou seja, a “emulsificação” de isolado protéico de frango com a montmorilonita (MMT) não foi tão eficiente quanto com o óleo essencial de orégano, que possui mais afinidade de interação com proteína.

5.6 Aplicação do filme em fígado com óleo essencial de orégano

5.6.1 Firmeza

A Tabela 15 apresenta os valores de firmeza (N) em amostras de fígado de frango usando diferentes revestimentos.

Tabela 15 – Firmeza (N) para carne de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 °C durante 12 dias.

Tempo (Dias)	T1*	T2*
0	7,04 ± 0,22 ^g	7,04 ± 0,22 ^g
2	7,31 ± 0,17 ^f	7,46 ± 0,80 ^f
4	7,81 ± 0,16 ^{d,e}	7,89 ± 0,31 ^e
6	7,92 ± 0,24 ^d	8,03 ± 0,13 ^d
8	9,08 ± 0,46 ^c	11,25 ± 0,24 ^c
10	16,17 ± 0,22 ^b	17,58 ± 0,12 ^b
12	22,34 ± 0,18 ^a	27,11 ± 0,12 ^a

*Média dos resultados da triplicata ± desvio padrão

T1: fígado embalado com filme constituído de glicerol, IPF e óleo essencial de orégano; T2: fígado embalado com filme constituído de glicerol e IPF.

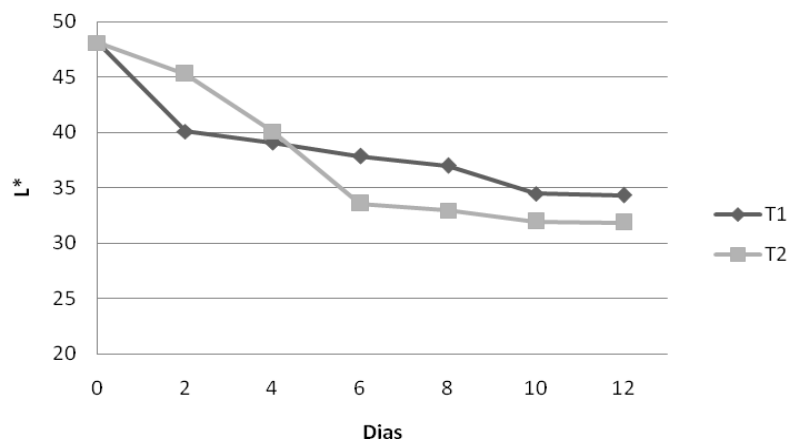
Pode-se observar que a partir do primeiro dia de armazenamento já houve diferença significativa na firmeza em ambos tratamentos. Ao longo dos dias de armazenamento houve aumento na firmeza da carne, provavelmente devido sua desidratação parcial na superfície, o que leva uma superfície mais abrasiva (GORNLY et al, 2000).

Pode-se verificar também que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, mas o aumento da firmeza foi mais acentuado no tratamento sem adição do óleo essencial de orégano, comprovando que o antimicrobiano adicionado influenciou menos na desidratação do fígado.

5.6.2 Cor

A Figura 19 mostra os valores de luminosidade, para as amostras de fígado de frango usando revestimentos diferentes.

Figura 19 - Efeito do óleo essencial de orégano e IPF na luminosidade (L^*) de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 oC durante 12 dias. T1: fígado embalado com filme constituído de glicerol, IPF e óleo essencial de orégano; T2: fígado embalado com filme constituído de glicerol e IPF



Valores de luminosidade (L^*) diminuíram a partir do primeiro dia de armazenamento para ambos os tratamentos. O tratamento T2 apresentou o maior escurecimento (33,75%), quando comparado com a outra amostra com proteína isolada de frango e óleo essencial de orégano, T1 (28,65%). DU et al (2011) relatam que a adição de óleo de orégano em filmes podem mudar sua cor natural.

Figura 20 - Efeito do óleo essencial de orégano e IPF no Chroma a^* de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 °C durante 12 dias. T1: fígado embalado com filme constituído de glicerol, IPF e óleo essencial de orégano; T2: fígado embalado com filme constituído de glicerol e IPF.

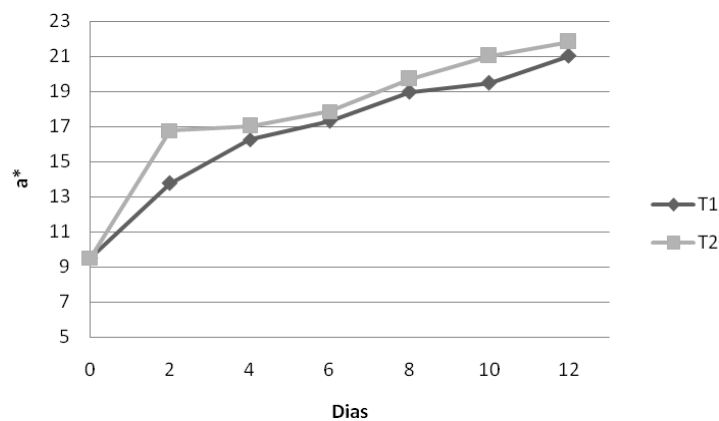
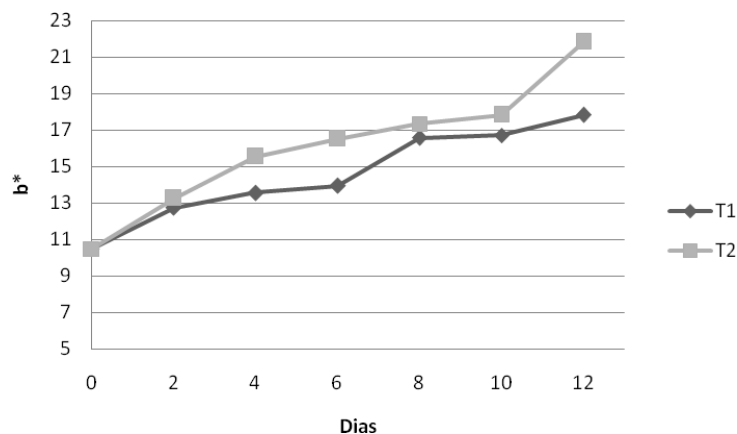


Figura 21 - Efeito do óleo essencial de orégano e IPF no Chroma b^* de fígado de frango armazenado a 4 ± 1 °C durante 12 dias. T1: fígado embalado com filme constituído de glicerol, IPF e óleo essencial de orégano; T2: fígado embalado com filme constituído de glicerol e IPF.



Como pode ser observado na Figura 20, os valores de a^* aumentaram ao longo dos dias de armazenamento, enquanto que o tratamento controle (T2) teve maior acréscimo em relação ao outro tratamento nos 12 dias de armazenamento, apresentando um escurecimento

mais alto. O tratamento T1 apresentou o menor escurecimento durante o armazenamento, indicando um efeito positivo do óleo essencial de óregano.

Os valores de b^* , apresentados na Figura 21, aumentaram para ambos os tratamentos desde o primeiro dia de armazenamento, apresentando diferença entre eles a partir do segundo dia. Este aumento indica uma tendência para uma cor mais amarelada e, portanto, maior escurecimento. O tratamento T1 apresentou menor escurecimento quando comparadas com T2.

DU et al (2011) relatam que filmes adicionados com diferentes óleos essenciais aumentaram os parâmetro a^* e b^* quando aplicados em maçãs. DIAS et al (2013) indicaram que a carne de frango no tempo zero aplicada com filme antimicrobiano de nanotubos de carbono obteve coloração mais leve e com o passar do tempo adquiriu a cor vermelha (a^*) e amarela (b^*).

5.6.3 Perda de Massa

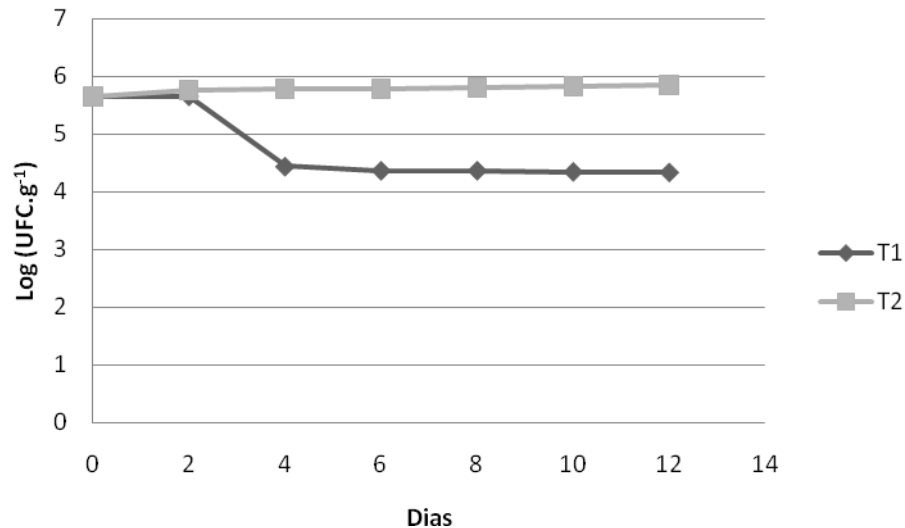
A carne de fígado foi embalada com dois tratamentos, tratamento 1 (T1): filme com glicerol, IPF e óleo essencial de óregano e tratamento 2 (T2): filme com glicerol e IPF. Após os 12 dias de armazenamento ambos os tratamentos tiveram perda de massa a partir do 4^o dia, sendo que o T1 obteve 42,2% de perda de massa e o T2, 46,6% de perda de massa. A amostra controle (T2) mostrou que teve maior perda de massa do que o tratamento com antimicrobiano.

QI et al (2011) e CORTEZ-VEGA et al (2013), tiveram perda de peso em maçãs quando revestidas com filmes de quitosana e isolado protéico de pescado com MMT, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com o presente trabalho, pois a amostra de controle apresentou maior perda de peso do que a amostra revestida com isolado protéico de frango e óleo essencial de óregano.

5.6.4 Análise antimicrobiana

A Figura 22 apresenta o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos em fígado de frango armazenados por 12 dias.

Figura 22 - Crescimento de micro-organismos psicrotróficos em fígado de frango armazenados a 4 ± 1 °C por 12 dias. T1: fígado embalado com filme constituído de glicerol, IPF e óleo essencial de orégano; T2: fígado embalado com filme constituído de glicerol e IPF.



Na Figura 22 podemos observar que houve um aumento na população de micro-organismos psicrotróficos para o T2 do 2º ao 12º dia de armazenamento, em relação a amostra embalada com filmes antimicrobianos. Este aumento não apresentou valores altos de crescimento microbiano na amostra.

Entretanto, a partir do 2º dia de armazenamento o T1 houve redução de multiplicação de micro-organismos em relação ao tempo zero, e deste dia em diante a inibição permaneceu constante. A redução foi de 1,2 unidades logarítmicas de patógenos, sendo que KHANJARI, KARABAGIAS e KONTOMINAS (2013) verificaram que as embalagens de filmes incorporado com óleo de orégano, resultaram na mesma redução que este trabalho, 1,2 log UFC.g⁻¹ na redução de *L. monocytogenes* em filés de peito de frango, já 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.

Portanto, podemos verificar que o filme antimicrobiano (T1) obteve 1,5 log UFC.g⁻¹ menor que o filme controle (T2) nas amostras de fígado de frango. Estes resultados comprovam que filme a base de isolado protéico de frango incorporado com óleo essencial de orégano foi eficaz contra o controle de micro-organismos psicrotróficos.

6. CONCLUSÕES

Através da produção de isolado protéico utilizando carne mecanicamente separada de frango se obteve um produto de maior valor agregado que a matéria-prima, concentrando a proteína a 80% e reduzindo a percentagem de gordura a 5,3% e ainda como alternativa é possível utilizá-lo para a produção de filmes protéicos.

Foi possível obter filmes nanocompósitos com propriedades físicas melhoradas a partir de isolado protéico de frango com adição de montmorilonita. Verificou-se que a elongação e a permeabilidade de vapor de água dos filmes não foram afetados pelas variáveis estudadas no experimento (isolado protéico de frango; glicerol; montmorilonita), mas outras propriedades sim. A menor solubilidade e opacidade e maior resistência a tração dos filmes ocorreram em alta concentração de montmorilonita (0,8 g.100 mL⁻¹), baixa de glicerol (0,2 g.100 mL⁻¹), intermediária de isolado proteico de frango (2 g.100 mL⁻¹) e tratamento térmico a 70 °C.

Quanto à atividade antimicrobiana dos filmes, a montmorilonita não apresentou propriedade antimicrobiana nesta matriz protéica estudada de isolado protéico de frango, porém com adição de 1,2% de óleo essencial de orégano obteve-se inibição frente aos micro-organismos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis*

A aplicação do filme constituído de isolado protéico de frango, glicerol e óleo essencial de orégano foi capaz de aumentar a vida útil de fígado de frango, inibindo até 1,5 Log.UFC.g⁻¹ de micro-organismos psicrotóxicos, em comparação com o filme controle, ou seja, sem adição de óleo essencial de orégano. Quanto às propriedades firmeza, cor e perda de massa, estas também foram menos alteradas em filmes antimicrobianos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIT-QUAZZOU, A.; CHERRAT,L.; ESPINA,L.; LORÁN, S.;ROTA,C.; PAGÁN,R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, p. 320-329, 2011.

ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.28, p.1-63, 2000.

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.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. DECRETO Nº 3029 de 16 de abril 1999. RESOLUÇÃO - RDC Nº 12. 2001. Art 11, inciso IV.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 18th ed, 2000.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC, 676p., 2001.

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

ARRUDA, P.V; RODRIGUES, R.C; FELIPE, M.G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v.26, p. 56-62, 2006.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Thin Plastic Sheeting**. E96-95, Philadelphia, USA, 1995.

ASTM, AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Thin Plastic Sheeting**. E96-95, Philadelphia, USA, 2001.

BERAQUET, N.J. Carne Mecanicamente Separada de Aves. Agregando valor a carne de aves. In: SEMINÁRIO E CURSO TEÓRICO PRÁTICO, 2000. Campinas. **Anais do Instituto Tecnológico de Alimentos**, 2000, v.1.

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) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

BILBAO-SAINZ, C.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; WOOD, D. F.; WILLIAMS, T. G.; MCHUGH, T.H. Nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method applied to edible films. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.58, p.11932-11938, 2010.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: UNICAMP, 1992. 143p.

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.

BONAGURIO, B.; PÉREZ,J.R.O.; FURUSHO-GARCIA,I.F.; SANTOS,C.L.; LIMA,A.L. Composição centesimal de carne de cordeiros Santa Inês puros e de seus mestiços abatidos com deferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.2387-2393, 2004.

BRANDELERO, R.P.H.; GROSSMANN, M.V.; YAMASHITA, F.hidrofilicidade de filmes de amido/poli(butileno adipato co-tereftalato)(Pbat) adicionados de tween80 e óleo de soja. **Polímeros**, v. 23, p. 270-275, 2013.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa no 4, de 31 de março de 2000. Regulamentos Técnicos

de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Lingüiça e de Salsicha. **Diário Oficial da União**, 2000. Seção 1, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de Salmonella sp. em Carcaças de Frangos e Perus. **Diário Oficial da União**, 2003. Seção 1, p. 9.

BURT, S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**. v. 23, p.729– 735, 2009.

CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por Campylobacter, durante o abate industrial. **Revista Higiene**, v.16, p. 89-94, 2002.

CHIVRAC, F.; POLLET, E.; DOLE, P.; AVÉROUS, L. Starch-based nano-biocomposites: Plasticizer impact on the montmorillonite exfoliation process. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 941-947, 2010.

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.

CLSI - Clinical laboratory standards institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, Document M2-A8**. Approved Standard – 8 Ed, v. 23, n. 1, 2003.

CORTEZ-VEGA, W.R.; BAGATINI, D.C.; SOUZA, J.T.A.; PRENTICE, C. Nanocomposite biofilms obtained from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and Monmorilonite: Evaluation of the physical, mechanical and barrier properties. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 90-98, 2013.

COSTA, P.G.; FONTANA, A.; VEIGA, I.; PRENTICE, C. Caracterização Funcional e Nutricional de um Isolado Protéico obtido a partir de Resíduos de Camarão Rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v.18, p. 7-18, 2007.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.342-346, 2002.

D'AOUST, J. Y. Salmonella Species. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2001, New Jersey. **Anais de microbiologia de alimentos**. New Jersey: Hardcover, 2001, p. 129-157.

DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU, P.; GROSSO, C. Composite films made with gelatin, tracetin, stearic and caproic acids: Effect of pH and surfactants addition on the functionality of films. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.408-416, 2007.

DELPECH, M.C.; MIRANDA, G.S.; SANTO, W.L.E. Dispersões aquosas a base de nanocompósitos de poliuteranos e argilas hidrofílicas brasileiras: síntese e caracterização. **Polímeros**, v. 21, p.315-320, 2011.

DIAS, M.V.; SOARES, N.F.F; BORGES, S.V.; SOUZA, M.M.; NUNES, C.A.; OLIVEIRA, I.R.N.; MEDEIROS, E.A.A. Use of allyl isothiocyanate and carbon nanotubes in an antimicrobial film to package shredded, cooked chicken meat. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3160- 3166, 2013.

DONADEL, M. E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v.19, p.380-386, 1999.

DU, W.X.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; HUA, S.S.T.; MCHUGH, T.H. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. **Formatex Research Center**, v.2 , p. 1124-1134, 2011.

DURÁN, E.; PÉREZ, R.; CARDOSO, W.; PÉREZ, O.A. Colorimetric analysis and sensory acceptance of raw sugar in the market of Viçosa-MG, Brazil. **Temas Agrarios**, v. 17, p. 30-42, 2012.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L.C.B.; GONÇALVES, P.V.M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C.J.; COLLARES-QUEIROZ, F.P. Films and edible coatings based on native starches and gelatin in the conservation and sensory acceptance of Crimson grapes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.391-393, 2007.

FAVRIN, S.J.; JASSIM, S.A.; GRIFFITHS, M.W. Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis in broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.217-224, 2001.

FDA - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Handbook. 2003.

FERNANDES, D.M.; SILVA, R.; HECHENLEITNER, A.A.W.; RADOVANOVIC, E.; MELO, M.A.C.; PINEDA, E.A.G. Synthesis and characterization of ZnO, CuO and mixed Zn and Cu oxide, **Materials Research Bulletin**, v. 115, p. 5-10, 2009.

FONTANA, A.; CENTENARO, G.S.; PALEZI, S.C.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Obtenção e avaliação de concentrados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, v.32, p. 2299-2303, 2009.

FONTANARI, G.G.; JACON, M.C.; PASTRE, I.A.; FERTONANI, F.L.; NEVES, V.A.; BATISTUTI, J.P. Isolado protéico de semente de goiaba (*Psidium guajava*): caracterização de propriedades funcionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.73-79, 2007.

FREITAS, I.R.; GAUTÉRIO, G.V.; RIOS, G.D.; PRENTICE, C. Functionality of Protein Isolates from Argentine Anchovy (*Engraulis anchoita*) Residue Obtained Using pH Shift Processing. **Journal of Food Science and Engineering**, v.1, p.374-378, 2011.

GONÇALVES, R.M.; GONÇALVES, J.R.; GONÇALVES, R.M.; OLIVEIRA, R.R.; OLIVEIRA, R.A.; LAGE, M.E. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada de frango (CMSF) e de bovino produzidas no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.553-559, 2009.

HUA, Y.; HUANG, Y.; QIU, A.; LIU X. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes. **Food Research International**, v.38, p.273-279, 2005.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008, v.2, p. 1-2, 2007.

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

JESUS, F.A.A.; MACEDO, Z.S. Síntese de Filmes Finos de Germanato de Bismuto. **Scientia Plena**, v. 6, p. 1-6, 2010.

JORDAN, J.; JACOB, K.I.; TANNENBAUM, R.; SHARAF, M.A.; JASIUK, I. Experimental trends in polymer nanocomposites: a review. **Materials Science and Engineering**, v.393, p.1-11, 2005.

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.

KHANJARI, A.; KARABAGIAS, I.K.; KONTOMINAS, M.G. Combined effects of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meats fillets. **Food Science and Technology**, v.53, p. 94-99, 2013.

KINSELLA, J.E. **Food Biochemistry**, New York: Marcel Dekker, 1987. cap14.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; & NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

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.

LEITE, A. M. O; FRANCO, R. M. Coliformes Totais e escherichia coli em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, p. 80-83, 2006.

LOPES, A.M. **Obtenção e avaliação de propriedades apresentadas por dois tipos de isolados protéicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*)**. 2005, 116 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275. 1951.

- MALI, S.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Ciências Agrárias**, v.31, p.137-156. 2010.
- MARSH, K.; BUGUSU, B. Food packaging: Roles, materials, and environmental issues. **Journal of Food Science**, v.72, p.39–55. 2007.
- MOOR, V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILLARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, v.50, p.1715, 1985.
- MORAES, A.R.F.; GOUVEIA, L.E.R.; SOARES, N.F.F.; SANTOS, M.M.S.; GONÇALVES, M.P.J.C. Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.33-36, 2007.
- MORAES, A.R.F.; VIDIGAL, M.C.T.R.; SOARES, N.F.F.; MORAES, L.P.; MELO, N.R.; GONÇALVES, M.P.J. Development and evaluation of antimicrobial and flavored film for using on pastry dough. **Ciência Rural**, v.41, p.537-543, 2011.
- MORAES, K.S. **Recuperação e utilização de proteína da carne de frango por processo de mudança de pH**. 2009, 126 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.
- MÓRI, C.; GARCIA, E.A.; ANDREGHETTO, C.; PELÍCIA, K. Carne de Aves Separadas Mecanicamente. **Revista Eletrônica de veterinária REDVET**, v. 7, n. 4, 2006.
- MOURA, P.R.; ALMEIDA, D.P.; LIMA, J.C.; PONCIANO, C.R.; CAMPOS, C.E.M. Propriedades estruturais de ligas e filmes finos calcogênicos submetidos á luz síncrotron. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v.28, p.1-6, 2009.
- MURIEL-GALET, V.; CERISUELO, J.P.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; LARA, M.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. **International journal of food microbiology**, v.157, p.195-201, 2012.
- MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of Salmonella isolated from food samples

involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.

NASCIMENTO, S.D.; OLIVEIRA, T.A.; SANTOS, F. K.G.; AROUCHA, E.M.M.; LEITE, R.H.L. Effect of Clay addition on the properties of chitosan biofilm. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.8, p.306-312, 2013.

NEVES, V.A.; LOURENÇO, E.J.; SILVA, M.A. Extração, Isolamento e Fracionamento da Proteína de Termoço (*Lupinus albus*) var. Multolupa. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.12, p.115-130, 2001.

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

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.

OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E.C. Foodborne diseases, main etiologic agents and general aspects: a review. **Revista HCPA**, v.30, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINI, J.S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.403.

OLIVEIRA, J.L.T.M.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E.T.O.; SOUZA, E.L.; TRAJANO, V.N.; SANTOS, B.H.C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian archives of biology and technology**, v.52, p.45-50, 2009.

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.

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes: No Caminho da Pesquisa. Cocal do Sul: Imprint, 2001. 155p.

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.

PATTABI, M.; AMMA, B.S.; MANZOOR, K. Photoluminescence study of PVP capped CdS nanoparticles embedded in PVA matrix. **Materials Research Bulletin**, v.42, p.28-35, 2007.

PALMU, P. S. T.; PROENÇA, P. S. P.; TRANI, P. E.; PASSOS, F. A.; GROSSO, C. R. F. Recobrimento de sementes de brócolis e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, v.64, p.291-297, 2005.

PINHEIRO, A.C.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W. S.; MARTINS, J.T.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. Utilização de revestimentos /filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, v.18, p. 18-28, 2010.

PÉREZ, L. M. A.; 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.

PERLO, F. Optimización de la etapa de lavado de carne de ave mecánicamente recuperada. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, N°31, Año XVI, novembro de 2005, p.241-258.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the Salmonella serovars. In: 7^a REVISION WORLD HEALTH ORGANIZATION COLLABORATING CENTRE FOR REFERENCE AND RESEARCH ON SALMONELLA, 1997, França. **Anais Pasteur Institute**, França, 1997.

QI, H.; HU, W.; JIANG, A.; TIAN, M. Extending shelf life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, p.62-66, 2011.

QUINTERO, E.S.M.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n. 1, 2000.

RADOSTITS, O.M.; GAY,C.C.; BLOOD,D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.661-666

RAWDKUEN, S.; SAI-UT, S.; KHAMSORN, S.; CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S. Biochemical and Gelling Properties of Tilapia Surimi and Protein Recovered Using Acid-Alkaline Pro- cess. **Food Chemistry**, v.112, p.112- 119, 2009.

RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, v.28, p.1539-1641, 2003.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol**, v.100, p. 80-84, 2005.

ROCHA-GUZMAN, N. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZALEZ-LAREDO, R. F.; RAMOS-GOMEZ, M.; RODRIGUEZ-MUNOZ, M. E.; REYNOSO-CAMACHO,R.; ROCHA-URIBE,A.; ROQUE-ROSALES,M.R. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandiery* v. *Shauer*) essential oil and mother liquors. **Food Chemistry**, v.102, p. 330-335, 2007.

ROCHA,M.; LOIKO,M. R.; GAUTÉRIO, G.V.; TONDO,E.C.; PRENTICE,C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v.116, p.666-673, 2013.

RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. São Paulo: Cárita, 2009. p.132.

ROLF, D.J. Antimicrobial Films for Food Applications: A Quantitative Analysis of Their Effectiveness. **Packaging Technology and Science**, v.20, p.231- 273, 2007.

ROSCA, I. D.; VERGNAUD, J. M. Problems of food protection by polymer packages. **Journal of Chemical Health and Safety**, v.14, p.14–20, 2007.

ROSSI, D.M. **Utilização de Carne Mecanicamente Separada de Frango para Produção de um Hidrolisado Protéico a partir de Enzimas Microbianas**. 2007, 112 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

ROSSI, D.M.; FLÔRES, S.H.; VENZKE, J.G.; AYUB, M.A.Z. Biological evaluation of mechanically deboned chicken meat protein hydrolysate. **Revista de Nutrição**, v.22, p. 879-885, 2009.

SALGADO, P. R.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MAURI, A. N.; MONTERO, M. P. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. **Food Hydrocolloids**, v.33, p. 74-84, 2013.

SARRIER, N.; ONDERB, E.; ERSOYB, S. The modification of Na-montmorillonite by salts of fatty acids: An easy intercalation process. **Colloids and Surfaces : Physicochemical and Engineering Aspects**, v.371, p.40–49, 2010.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N.F.S.; NOBREGA, J.E.; JUNIOR, M.A.W.; BARBOSA, K.B.F.; VOLP, A.C.P.; ZERDAS, E.R.M.A.; WURLITZER, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v.20, p.85-89, 2009.

SANTOS, S.M. **Influência da adição de montmorilonita nas propriedades térmicas e mecânicas de nanocompósitos com matriz de epóxi**. Dissertação (Mestrado), 2011, 109 f. Instituto Alberto Luiz de Coimbra, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES,C.; FRANCHIN,P.R.; ALVES,S.H. Antimicrobial activity essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enterica* sorovars from avian source. **Ciência Rural**, v. 37, p.803-808, 2007.

SAYANJALI, S.; GHANBARZADEH, B.; GHIASSIFAR, S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. **LWT e Food Science and Technology**, v. 44, p. 1133-1138, 2011.

SCHLEMMER, D.; ANGÉLICA,R.M.; GOMES,A.C.M.M.; SALES,M.J.A. Morfologia de filmes de amido termoplástico e montmorilonita (TPS/MMT) usando óleos vegetais do cerrado como plastificantes.In: 10º. CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros**. Foz do Iguaçu, PR. 2009.

SILVA, E. M. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão.** Dissertação (Conclusão de curso), 2011, 43 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

SILVA, J. A. Micro-organismos patogênicos em carne de frango. **Revista Higiene Alimentar**, n. 58, outubro, 1998.

SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PEREZ,D.V.; FRANCO, B.D.G.M. Oregano essential oil: influence of the composition on the inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.136-141, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SLAVUTSKY, A.M.; BERTUZZI,M.A.; ARMADA,M.; GARCÍA, M.G.; OCHOA, N.A. Preparation and characterization of montmorillonite/brea gum nanocomposites films. **Food Hydrocolloids**, v.35, p.270-278, 2014.

SOARES, N. F. F. **Bitterness Reduction in Citrus Juice through Naringinase Immobilized into Polymer film.** Dissertação (Pós Doutorado), 1998, 130 f. Cornell University, Ithaca, NY.

SOARES, N.F.F; SILVA,W.A.; PIRES,A.C.S.; CAMILLOTO,G.P.; SILVA,P.S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v.56, p.370- 378, 2009.

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

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3913–3916, 2000.

SOUZA, C.O.; SILVA, L.T.; DRUZIAN, J.I. Comparative studies on the characterization of biodegradable cassava starch films containing mango and acerola pulps. **Química Nova**, v.35, p.262-267, 2012.

SOUZA, M.A.; PESSAN, L. A.; JUNIOR, A. R. Nanocompósitos de poli (cloreto de vinila) (PVC) / Argilas organofílicas. **Polímeros. Ciência e Tecnologia**, v. 16, p.257, 2006.

SOUZA, S.M.A.; SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C. Propriedades físicas de filmes comestíveis a base de proteínas miofibrilares de carne bovina. **Ciência Agrária**, v.33, p.283-296, 2012.

TAVARES, L. L. **Efeito da adição de argilas modificadas na estrutura e propriedades funcionais de biofilmes produzidos a base de zeína**. Dissertação (mestrado), 2010. 75f. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Pardo, SP, Brasil.

TEDESCO, A. Nanotecnologia em Compostos Poliméricos. In: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2007. **Anais do SENAI-CETEP**, 2007.

TERRA, N.N. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 2000.

TUNÇ, S.; DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**, v.48, p.414-424, 2010.

TURINA, A. V.; NOLAN, M. V.; ZYGADLO, J. A.; PERILLO, M. A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, p. 101-113, 2006.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual UBABEF**, 2013.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.; MOEZELAAR, R. The phenolichydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561- 1568, 2002.

URBANSKI, J.C.; LOBO, V.S.; FERREIRA, R.J. Carne Mecanicamente Separada de Aves (CMSF) vs Micro-organismos Mesófilos. In: II ENCONTRO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, Paraná, 2010. **Anal do II Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**, Paraná, outubro. 2010.

VELDHUIZEN, E.J.; CREUTZBERG, T.O.; BURT, S.A.; HAAGSMAN, H.P. Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in streak tartare. **Journal of Food Protection**, v.70, p.2127-2132, 2007.

VUGIA, D. J. ; SAMUEL, M. FARLEY, M. M; MARCUS, R.; SHIFERAW, B.; SHALLOW, S; SMITH, K.; ANGULO, F. J. The Emerging Infections Program Food Net Working Group. Invasive Salmonella infections in the United States, Food Net, 1996-1999: incidence, serotype, distribution and outcome. **Clinical Infections Diseases**. v. 38, p. 149-156, 2004.

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.

YAU, M.A.C.L.M.; FRAUSTOHE.G.; YAMAGUCHI, M.U. Detecção de Campylobacter termofílicos e outros microorganismos indicadores de qualidade em frangos destinados à exportação. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, p. 381-404, 2009.

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

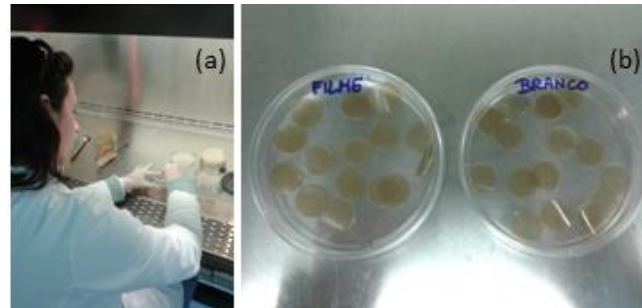
YU,L.; DEAN,K.; LI,L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Polymer Science**, v.31, p.576-602, 2006.

ZAVAREZE, E.R.; HALAL, S.L.M.; TELLES, A.C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ,C. Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.4, p.53-57, 2012.

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.

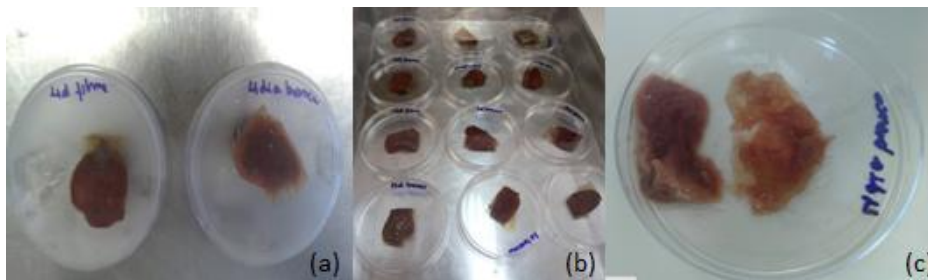
APÊNDICES

Apêndice 1 - Teste de difusão de disco



(a) corte asséptico dos filmes; (b) Discos dos filmes incorporados com agentes antimicrobianos, com swab em placas com ágar Miller ilton

Apêndice 2 - Aplicação do filme em miúdos de frango (fígado)



(a) miúdos de frango embalado em filme antimicrobiano e filme controle ; (b) miúdos de frango embalados e armazenados sob refrigeração; (c) miúdo de frango retirado da embalagem.

Apêndice 3 - Análise da contagem



(a) bancada com material para desenvolvimento do trabalho; (b) placas incubadas na estufa a 20°C; (c) placa para contagem de micro-organismos psicotróficos do 4º dia.