



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ROSIANE DE SOUZA SILVA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ANTIMICROBIANOS OBTIDOS A  
PARTIR DE PROTEÍNAS DE PESCADO PINTADO (*PSEUDOPLATHYSTOMA*  
*CORRUSCANS*) E INCORPORADOS COM ÓLEOS ESSENCIAS**

**DOURADOS-MS**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ROSIANE DE SOUZA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ANTIMICROBIANOS OBTIDOS A  
PARTIR DE PROTEÍNAS DE PESCADO PINTADO (*PSEUDOPLATHYSTOMA*  
*CORRUSCANS*) E INCORPORADOS COM ÓLEOS ESSENCIAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós  
Graduação – Mestrado em Ciência e Tecnologia  
Ambiental, como requisito para obtenção do  
título de Mestre. Orientador: Prof. Dr. William  
Renzo Cortez-Vega

DOURADOS - MS

2017

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586p Silva, Rosiane de Souza.  
Produção e caracterização de filmes antimicrobianos obtidos a partir de proteínas de pescado pintado (*Pseudoplathystoma corruscans*) e incorporados com óleos essenciais. / Rosiane de Souza Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2017.  
77f.

Orientador: Prof. Dr. William Renzo Cortez-Vega.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Isolado proteico. 2. Filmes. 3. Glicerol. 4. Óleo essencial de cravo. I. Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

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



### Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Produção e Caracterização de filmes antimicrobianos obtidos a partir de proteínas de pescado pintado (*Pseudoplathystoma corruscans*) e incorporados com óleos essenciais”**, de autoria de **Rosiane de Souza Silva**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. William Renzo Cortez-Vega  
Presidente da banca examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Di Loreto da Cruz Akita  
Membro Examinador (UEMS)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosalinda Arévalo Pinedo  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 31 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me dar saúde, coragem, força e determinação para superar todas as dificuldades.

Ao meu orientador William Renzo Cortez-Vega, por todo o tempo, auxílio e dedicação durante o processo de realização deste trabalho.

À minha mãe e meu pai, Ana e Guilherme, pelo amor, educação, compreensão, apoio, incentivo, confiança em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Erik Mendes Miura, pelo carinho, ajuda e paciência principalmente nos momentos de maior dificuldade.

Às minhas amigas Bárbara, Cássia e Carmem que estão sempre comigo me incentivando, auxiliando e acreditando no meu potencial.

À pós doutoranda Sandriane pelo apoio, ensinamentos e auxílios nas análises.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, o meu muito obrigado!

## RESUMO

O processamento industrial de pescado gera uma grande quantidade de subprodutos ricos em proteínas, porém por apresentarem baixo valor comercial, são descartados. O descarte indiscriminado e o acúmulo de embalagens não biodegradáveis ou com degradação muito lenta vêm causando sérios problemas ambientais, uma das alternativas encontradas é o estudo e desenvolvimento de filmes biodegradáveis que possam atuar como embalagens ou como componente dessas embalagens. Entre os biopolímeros naturais mais utilizados para obtenção do filme, estão os polissacarídeos e as proteínas, pois são provenientes de fontes renováveis e são capazes de formar uma matriz contínua e coesa. O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar filmes obtidos a partir de proteínas de Pintado (*Pseudoplathystoma corruscans*) incorporados com óleo essencial de cravo. O isolado proteico de Pintado (IPP) foi obtido pelo método de mudança de pH, utilizando como matéria-prima a carne mecanicamente separada de Pintado. A solução filmogênica foi elaborada utilizando as variáveis: IPP (Isolado proteico de Pintado), glicerol e o óleo essencial de cravo (OEC), conforme a técnica de *casting*, segundo um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Foram avaliadas as propriedades de resistência a tração (RT) e alongação (E); solubilidade; permeabilidade ao vapor de água (PVA); opacidade; microscopia eletrônica de varredura (MEV); calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X (DRX) e análise microbiológica. O IPP obtido foi caracterizado e apresentou elevado teor proteico (95,21% em base seca), boa capacidade de retenção de água e alta solubilidade. Os filmes apresentaram propriedades diferentes dependendo das concentrações das variáveis estudadas no experimento. A alongação, a solubilidade e o PVA dos filmes foram maiores nos tratamentos com elevado teor de glicerol; a resistência a tração variou de 0,55 a 6,70 MPa, sendo que os maiores valores foram obtidos nos tratamentos com alta concentração de IPP e baixo teor de glicerol; a opacidade dos filmes foi afetada pela junção entre o IPP e o OEC, onde tratamentos com altas concentrações dessas variáveis mostraram-se mais opacos. A análise de MEV revelou a presença de muitas irregularidades superficiais e micro-orifícios. Através da análise de DSC foi possível concluir que o experimento sem OEC gerou pico de fusão em temperatura menor que nos tratamentos com 0,1g e 0,5g de OEC que foram respectivamente de 145,36%, 146,39% e 154,44%, evidenciando maior estabilidade térmica dos filmes formulados com óleo. Com análise de DRX ficou evidente que os filmes apresentam baixo grau de cristalinidade. Devido a baixa concentração de óleo essencial de cravo utilizado, os filmes não foram capazes de inibir a atividade microbiana.

**Palavras-chave:** isolado proteico; filmes; glicerol; óleo essencial de cravo.

## ABSTRACT

The industrial fish processing leads to a large amount of protein-rich byproducts, but because of its low commercial value they are discarded. The indiscriminate disposal and the accumulation of low or non-degradable packages can cause environmental problems. One alternative is the study and development of biodegradable films that would be able to act as a package or a component for it. Among all natural biopolymers the most used to obtain the films are polysaccharides and proteins, as they are renewable sources and capable of forming a continuous and cohesive matrix. The objective of this study was producing and characterizing protein films obtained from Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) incorporated with essential oil. The protein isolate (PI) of Pintado was obtained through the process of alkaline solubilisation and isoelectric precipitation, using as raw material the mechanically deboned fish meat (MDFM) of Pintado. The filmogenic solution was prepared using variables as: the protein isolate, glycerol and clove essential oil, following the Casting technique, using a factorial design of  $2^3$ . The properties evaluated were the tensile strength and elongation, solubility, water vapor permeability, opacity, scanning electronic microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD) and microbiological analysis. The obtained PI was characterized and presented high proteic value (95,21% in dry bases), good water retention capacity and high solubility. The films presented different properties depending on the concentration and the variables studied in the experiment. Elongation, solubility and water vapor permeability presented higher values in treatments with high quantity of glycerol; the tensile strength ranged from 0,55 to 6,70MPa, and the highest values were obtained in the treatments with high concentration of PI and low quantity of glycerol; the film opacity was affected by the PI and the clove essential oil, and the treatments with high concentrations of these variables were more opaque. The SEM analysis revealed the presence of many surface irregularities and micro orifices. Through the DSC analysis is possible to conclude that the experiment without clove essential oil caused a melting peak in lower temperature than in treatments with 0,1g and 0,5g of essential oil, which were respectively 145,36%, 146,39% and 154,44%, showing the high thermal stability of films developed with oil. The XRD analysis showed the low crystallinity of films. Due to the low concentration of clove essential oil used, the films were not able to inhibit microbial activity.

**Key-words:** protein isolate; films; glycerol; clove essential oil.

## 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;  
CMSP – Carne Mecanicamente Separada de Pintado;  
CRA – Capacidade de retenção de água;  
CRO – Capacidade de Retenção de óleo;  
DSC – Calorimetria diferencial de varredura;  
DTA – Doenças transmitidas por alimentos;  
E – Elongação;  
F – Fisher  
FURG – Universidade Federal do Rio Grande;  
G – glicerol;  
g – Grama;  
GL – graus de Liberdade;  
HCl – ácido clorídrico;  
IP – Isolado proteico;  
IPP – Isolado proteico de Pintado;  
MEV – Microscopia eletrônica de varredura;  
m<sup>2</sup> – Metro ao quadrado;  
mg – miligrama;  
mL – Mililitro;  
mm – milímetros;  
MQ – Quadrado Médio;  
N – Newton;  
NaCl – Cloreto de sódio;  
NaOH – Hidróxido de sódio;  
O – Opacidade;  
OEC – Óleo Essencial de Cravo;  
PVA – Permeabilidade ao vapor de água;  
P:V – Peso/Volume;

RT – Resistência à tração;

SQ – Soma dos Quadrados;

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário $2^3$ .....	25
Tabela 2. Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário $2^3$ , com os valores codificados e reais.....	26
Tabela 3. Composição proximal da carne mecanicamente separada de Pintado e do isolado proteico de Pintado.....	31
Tabela 4. Valores obtidos pelos filmes de proteína de Pintado, correspondente a cada experimento, em relação às variáveis dependentes analisadas. ....	36
Tabela 5. Verificação da validade estatística do modelo para opacidade.....	36
Tabela 6. Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade.....	38
Tabela 7. Verificação da validade estatística do modelo para permeabilidade ao vapor de água. ....	41
Tabela 8. Verificação da validade estatística do modelo para resistência à tração.....	44
Tabela 9. Verificação da validade estatística do modelo para resistência à elongação. ....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> .....	15
Figura 2. Solubilidade do IPP em função do pH .....	33
Figura 3. Capacidade de retenção de água (CRA) do isolado proteico de Pintado.....	34
Figura 4. Superfície de contorno para opacidade em relação as concentrações de proteína e óleo essencial de cravo. ....	37
Figura 5. Superfície de contorno para solubilidade em relação as concentrações de proteína e óleo essencial de cravo. ....	39
Figura 6. Superfície de contorno para solubilidade em relação as concentrações de proteína e glicerol. ....	40
Figura 7. Superfície de contorno para permeabilidade ao vapor de água em relação as concentrações de glicerol e proteína.....	42
Figura 8. Superfície de contorno para permeabilidade ao vapor de água em relação as concentrações de glicerol e óleo essencial de cravo.....	42
Figura 9. Superfície de contorno para resistência à elongação em relação as concentrações de proteína e glicerol.....	46
Figura 10. Superfície de contorno para resistência à elongação em relação as concentrações de proteína e óleo essencial de cravo.....	46
Figura 11. Superfície de contorno para resistência à elongação em relação as concentrações de glicerol e óleo essencial de cravo.....	47
Figura 12. Microestrutura eletrônica de varredura dos filmes.....	49
Figura 13. DSC de filmes de isolado proteico de Pintado.....	51
Figura 14. Difratoograma de filme de isolado proteico.....	52
Figura 15. Atividade antimicrobiana de filmes de isolado proteico de Pintado com e sem incorporação de óleo essencial de cravo para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	53
Figura 16. Atividade antimicrobiana de filmes de isolado proteico de Pintado com e sem incorporação de óleo essencial de cravo para <i>Escherichia coli</i> . ....	54
Figura 17. Atividade antimicrobiana de filmes de isolado proteico de Pintado com e sem incorporação de óleo essencial de cravo para <i>Salmonella Enteritidis</i> . ....	54

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
NOMENCLATURA.....	3
LISTA DE TABELAS .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	6
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
3.1 Piscicultura em Mato Grosso do Sul.....	12
3.2 Subprodutos da industrialização de pescados .....	12
3.3 Proteínas do pescado .....	13
3.4 Pintado ( <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> ).....	14
3.5 Isolado proteico de Pintado (IPP).....	15
3.6 Filmes biodegradáveis.....	16
3.6.1 Obtenção de filmes biodegradáveis pelo método de “casting” .....	17
3.6.2 Plastificantes .....	17
3.6.2.1 Glicerol .....	18
3.7 Filmes antimicrobianos .....	19
3.7.1 Óleo essencial de cravo.....	20
3.8 Contaminação microbiana.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Matéria-prima para obtenção da proteína recuperada .....	23
4.2 Obtenção de isolado proteico de Pintado (IPP).....	23
4.3 Caracterização do isolado proteico de Pintado (IPP).....	24
4.3.1 Composição proximal .....	24
4.3.2 Análise da funcionalidade.....	24
4.3.2.1 Solubilidade .....	24
4.3.2.2 Capacidade de retenção de água (CRA) .....	24
4.3.2.3 Capacidade de retenção de óleo (CRO).....	25
4.4 Obtenção dos filmes .....	25

4.5 Caracterização dos filmes obtidos.....	27
4.5.1 Opacidade .....	27
4.5.2 Solubilidade em água.....	27
4.5.3 Propriedades mecânicas .....	27
4.5.4 Permeabilidade ao vapor de água .....	28
4.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	28
4.5.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	29
4.5.7 Difração de raios-X (DRX).....	29
4.5.8 Análise microbiológica de filmes de IPP incorporados com óleo essencial de cravo.....	29
4.6 Análise estatística.....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>31</b>
5.1 Caracterização da proteína recuperada.....	31
5.1.1 Composição proximal .....	31
5.1.2 Análise de funcionalidade.....	32
5.1.2.1 Solubilidade .....	32
5.1.2.2 Determinação da capacidade de retenção de água (CRA) .....	34
5.1.2.3 Determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO).....	35
5.2 Obtenção e caracterização do filme .....	35
5.2.1 Planejamento experimental.....	35
5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	47
5.2.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	49
5.2.4 Difração de Raios-X (DRX) .....	52
5.2.5 Análise microbiológica de filmes de IPP incorporados com óleo essencial de cravo.....	53
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os plásticos são usados em grande escala na produção de embalagens, principalmente de produtos alimentícios e utensílios domésticos, além de suas aplicações científico-tecnológicas. Sendo assim, a utilização dos plásticos tornou-se determinante nas indústrias, principalmente devido as suas propriedades mecânicas e ao seu poder de substituição em diversos segmentos das áreas tecnológicas (CBIP,1996).

Materiais plásticos não são biodegradáveis e seu descarte inadequado tem sido efetuado sistematicamente pelo homem causando além dos óbvios problemas de poluição ambiental, riscos à população ao entupirem bueiros e impedirem o escoamento das águas das chuvas (PACHECO, 2002). Esses problemas ambientais causados pelo descarte de polímeros sintéticos no meio ambiente despertam interesse de se desenvolver filmes biodegradáveis que possam atuar como embalagens ou como componente das mesmas (FERREIRA et al. 2009).

Os filmes plásticos biodegradáveis são obtidos a partir de materiais biológicos, que agem como barreira a elementos externos, e podem proteger os produtos embalados de danos físicos e biológicos, assim como impedirem a volatilização de compostos e a perda de umidade, aumentando a vida-útil do produto. Entre os biopolímeros naturais mais utilizados na obtenção de filmes, estão os polissacarídeos e as proteínas, os quais apresentam algumas vantagens, por serem provenientes de fontes renováveis e capazes de formar uma matriz contínua e coesa (RHIM e NG, 2007).

Para a formação da matriz filmogênica, as proteínas são mais interessantes que os polissacarídeos (homopolímeros), por possuírem em sua estrutura até 20 monômeros diferentes (aminoácidos) que conferem uma gama maior de propriedades funcionais e potenciais por formar ligações intra e intermoleculares diferindo nas posições, tipos e energia (GONTARD e GUILBERT, 1996). Estão amplamente distribuídas na natureza, além disso, poucos alimentos possuem um teor proteico com todos os aminoácidos essenciais, como as de origem animal. (OLIVEIRA e MARCHINI, 1998).

As proteínas de pescado, entre elas as proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas têm sido utilizadas como material para formação de filme (CUQ et al. 1995). Os filmes à base de proteínas de pescado formam redes, apresentando boas propriedades mecânicas, como plasticidade e elasticidade, e boa barreira ao oxigênio, porém absorvem muita água, devido à higroscopicidade dos aminoácidos das moléculas de proteína. Esta característica pode ser modificada pela adição de plastificantes e/ou aditivos (PAIVA et al. 2006; ZAVAREZE et al, 2012).

O aumento no número das doenças transmitidas por alimentos provenientes de micro-organismos patógenos levou à intensificação de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de embalagens com atividade antimicrobiana. 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 patógenos e deteriorantes em alimentos (OJAGH et al. 2010).

A procura por novos agentes antimicrobianos e antioxidantes, a partir de plantas, para uso nas indústrias alimentícias, é intensa, em decorrência da crescente resistência dos micro-organismos patogênicos aos produtos sintéticos (TEPE et al. 2004). Neste sentido, a utilização de plantas aromáticas, possuidoras de óleos essenciais, geralmente com ações flavorizantes, com comprovada ação antibacteriana e antioxidante, pode ser uma alternativa interessante para a conservação de alimentos, diminuindo a concentração de aditivos sintéticos nesses produtos (SILVESTRI et al. 2010).

O uso de compostos antimicrobianos naturais tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos, por serem mais seguros em relação aos aditivos químicos (SANTOS et al. 2010). Entre os agentes antimicrobianos mais usados e, com efeito, mais eficaz estão os óleos essenciais de cravo, orégano, alecrim, tomilho e salvia (BENAVIDES, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produção e caracterização de filmes antimicrobianos obtidos a partir de proteínas de pescado Pintado (*Pseudoplathystoma coruscans*) e incorporados com óleo essencial de cravo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver processos adequados para a obtenção do isolado proteico (IP), utilizando como matéria-prima subprodutos do Pintado (*Pseudoplathystoma coruscans*);
- Avaliar as propriedades físico-químicas e funcionais do isolado proteico;
- Desenvolver filmes a partir de solução filmogênica contendo IP, plastificante e óleo essencial de cravo;
- Avaliar as propriedades mecânicas, opacidade, solubilidade e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes obtidos.
- Avaliar a microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X (DRX) dos filmes.
- Verificar a atividade antimicrobiana dos filmes de isolado proteico de Pintado incorporados com óleo essencial de cravo.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Piscicultura em Mato Grosso do Sul**

No Mato Grosso do Sul, a piscicultura vem ganhando espaço nas últimas duas décadas, visto que além de representar uma ótima fonte de renda o pescado apresenta proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos insaturados e vitaminas, bem como baixo teor de colesterol, constituindo uma opção de consumo mais saudável do que as outras carnes (GONÇALVES, 2011).

A piscicultura tem se desenvolvido também devido a pratica da pesca esportiva, dos pesque e pague e devido à proximidade com os estados de São Paulo e Paraná, que demandam grandes quantidades de alevinos e de peixes (PROCHMANN e TREDEZINI, 2003).

Dos dez municípios que mais produzem peixe através da piscicultura no estado, sete encontram-se na microrregião de Dourados. A região demonstra potencialidades diferenciadas das demais por contar com um grande número de pequenas propriedades fundiárias e por ser uma região produtora de grandes volumes de grãos, como o milho e a soja (PROCHMANN e TREDEZINI, 2003).

No Centro-Oeste, a produção da aquicultura continental foi de 75,1 mil toneladas no ano de 2011, com destaque para a criação de pacu-caranha e outros peixes redondos e, em menor escala, do surubim e pintado *Pseudoplatystoma* spp. e seus híbridos, sendo a região da Grande Dourados no Mato Grosso do Sul um dos principais polos de produção (BRABO et al 2016).

#### **3.2 Subprodutos da industrialização de pescados**

Resíduo ou subproduto é todo material descartado nas cadeias de produção e consumo que, por limitações tecnológicas ou de mercado, não apresenta valor de uso ou comercial e, quando manejado de forma inadequada, pode resultar em impactos negativos para o meio ambiente (MARTINS, 2011).

Nos pescados o filé é a parte de maior valor econômico e seu rendimento varia de acordo com o tamanho do peixe e com o domínio tecnológico das empresas de processamento. Portanto, o seu rendimento pode chegar de 30% a 40% em peso do pescado, sendo o restante considerado subproduto que não possui valor comercial (restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e intestinos). Assim, fontes alternativas de proteína, como os subprodutos da industrialização de pescado, tornam-se importantes,

pois constituem cerca de 60% a 70% da matéria-prima e são descartados pelas indústrias causando danos ao meio ambiente (NOLSOE e UNDELAND, 2009). A falta de direcionamento destes subprodutos ocasiona o desperdício desta matéria-prima que possui grande potencial tecnológico para um desenvolvimento sustentável, impedindo a viabilidade destes resíduos para fins alternativos de produção (BERY et al. 2012).

Os subprodutos da industrialização do pescado, entre eles os pescados de menor tamanho, normalmente são utilizados para fabricação de farinha ou simplesmente descartados. Uma alternativa para o aproveitamento integral dos subprodutos é a recuperação de seus principais componentes, entre eles as proteínas (OETTERER et al. 2006).

A carne mecanicamente separada (CMS) de pescado é um produto obtido de uma única espécie ou da mistura de espécies de pescado com características sensoriais semelhantes (NEIVA, 2006). E pode ser utilizada, para a obtenção de filmes biodegradáveis a partir das proteínas miofibrilares obtidas do resíduo do pescado.

Em geral o potencial mercadológico dos pescados está nos filés do peixe, sendo um produto de maior preferência dos consumidores. Entretanto, no processo de filetagem há geração de subprodutos, como cabeças, espinhos, pele, ossos e carcaças, que são em muitos casos descartados, tendo como consequência, a poluição ambiental.

### **3.3 Proteínas do pescado**

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente de alta sensibilidade à hidrólise e composição balanceada em aminoácidos, principalmente os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (NEVES et al. 2004).

A carne de pescado destaca-se por apresentar uma composição química peculiar que lhe confere alto valor biológico, proteína de alta digestibilidade, rica em aminoácidos essenciais, possuem proteínas com valor nutritivo ligeiramente superior ao das carnes vermelhas, sendo um alimento mais saudável do ponto de vista nutritivo (OGAWA e MAIA, 1999; SOARES e GONÇALVES, 2012). Os principais componentes químicos da carne de pescado são água (50 a 85%), proteína (12 a 24%) e lipídios (0,1 a 22%), os 2% restantes são constituídos por minerais (0,8 a 2%), glicídios (0,1 a 3%) e vitaminas (BRITTO et al. 2014; OGAWA e MAIA, 1999). As diferenças na composição em músculo de pescado dependem das espécies, tamanho, sexo e o

estado nutricional dos pescados (CORRÊIA et al., 2012; ORDÓÑEZ, 2005; YARNPAKDEE et al., 2014).

Conforme ORDÓÑEZ et al., (2005), as proteínas musculares do pescado estão classificadas de acordo com sua solubilidade em três grupos principais: proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e do estroma, sendo as proteínas solúveis utilizadas no presente trabalho.

As proteínas sarcoplasmáticas representam aproximadamente 20 a 25 % das proteínas do músculo, são solúveis em água e como principais características estão a sua capacidade de adesão às proteínas miofibrilares impedindo a formação de gel de alta elasticidade, baixa viscosidade, baixa capacidade de retenção de água e baixa capacidade de absorção de sabores e corantes (GUND et al., 2005).

As proteínas miofibrilares representam de 66 a 77 % do total de proteínas do músculo do pescado, sendo que, neste grupo, as principais são a miosina e a actina (GUND et al., 2005). Estas possuem importância principalmente por suas propriedades funcionais, sendo a miosina responsável pelas propriedades de gelificação, retenção de água e de emulsificação (AYALA, 2001).

As proteínas do estroma ou tecido conjuntivo, que em média representam 3 % da proteína muscular total, consistem predominantemente de colágeno e elastina (VENUGOPAL, 2009). Estas proteínas, conforme citado por alguns pesquisadores, são insolúveis em água, soluções salinas ou alcalinas e são facilmente solubilizadas por aquecimento (OETTERER et al., 2006; CORTEZ-VEGA, 2011; ZAVAREZE, 2012; ROCHA, 2012).

### **3.4 Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**

O Pintado pertence à subordem Characoidei, família Pimelodidae, gênero *Pseudoplatystoma* e espécie *corruscans*, de acordo com Moyle e Cech (1988) está classificado na ordem dos Siluriformes que engloba muitas espécies de bagres ou peixes de couro que encontram-se distribuídos por todos os continentes.

Kubitza et al., (1998), relatam que esses bagres possuem características zootécnicas, organolépticas e de mercado bastante atrativas para a piscicultura industrial. A carne do Pintado é de cor clara, textura firme, sabor pouco acentuado, apresentando baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares. (REID, 1983; SATO et al., 1988).

A produção do Pintado vem sendo intensamente estudada na última década, pelo elevado valor de venda, e também, pelo excelente sabor e textura da sua carne. Os valores do rendimento do processamento são importantes, principalmente para a indústria.

**Figura 1.** *Pseudoplatystoma corruscans*



Fonte: Benites, 2008.

### **3.5 Isolado proteico de Pintado (IPP)**

Isolamento de proteína é basicamente um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes (MARTINS, 2009). São basicamente produtos desidratados e moídos, com conteúdo médio de 75% de proteínas, que podem apresentar ou não sabor e aroma de pescado, dependendo do método de obtenção utilizado (ORDOÑEZ, 2005).

Isolados e hidrolisados proteicos de pescado, geralmente são obtidos por solubilização química, ácida ou alcalina, ou por via enzimática, respectivamente, a partir de subprodutos ou de pescado inteiro (MARTINS, 2009).

As proteínas do músculo de pescado podem ser isoladas por solubilização em pHs extremos. A proteína pode ser precipitada no ponto isoelétrico, que rende uma suspensão heterogênea, com um teor de proteína próximo a 200 g/L (BRENNER et al., 2009).

As características fundamentais dos isolados proteicos são o elevado valor biológico, o baixo custo e a fácil conservação, possuindo concentrações de proteínas superiores à do músculo de pescado, grande capacidade de hidratação, além de uma alta digestibilidade, se comparado a outras proteínas, como a do ovo e a da carne bovina (VIDAL et al., 2011).

A concentração de proteínas obtida durante o processo por mudança de pH (conhecido como *pH shifting process*) é determinada por três fatores principais, a solubilidade das proteínas em condições extremas de pH, o tamanho do sedimento insolúvel formado durante o processo de centrifugação e a solubilidade das proteínas ao pH selecionado para a precipitação (NOLSOE e UNDELAND, 2009). Alguns fatores interferem na extração da proteína, como: qualidade da matéria-prima, relação sólido/líquido, pH, temperatura, velocidade de centrifugação e força iônica, contudo a máxima recuperação durante o processo de extração é de vital importância para determinar a quantidade de proteína no isolado (KAIN et al., 2009).

### **3.6 Filmes biodegradáveis**

Segundo a ASTM (2000), polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis, nos quais a degradação resulta primariamente da ação de micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural.

Materiais poliméricos naturais, tais como polissacarídeos (amido e celulose), proteínas e triglicerídeos (óleos vegetais), são biodegradáveis e podem, portanto, desempenhar um papel significativo para resolver os problemas ambientais provocados pelo uso de materiais poliméricos sintéticos (CORTEZ-VEGA et al., 2013).

Os filmes biodegradáveis são materiais de espessura fina, preparados a partir de macromoléculas, que agem como barreira a elementos externos e consequentemente protegem o produto e aumentam a sua vida de útil (HENRIQUE et al., 2008; KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997). Estes filmes biodegradáveis podem ser utilizados como coberturas comestíveis, quando são aplicados diretamente na superfície de alimentos, e como filmes, quando possuem estrutura própria independente (PRATES, 2010).

São funções das embalagens, melhorar a apresentação de um produto, através das características expostas nas mesmas; facilitar o transporte e o acesso ao produto; trazer informações ao consumidor; além de aumentar o valor agregado ao produto. Essencialmente, sabe-se que a principal finalidade das embalagens é proteger os alimentos contra qualquer tipo de ação de deterioração, sejam elas de natureza química, física ou microbiológica, desde o acondicionamento até o consumo final, assegurando a manutenção de suas próprias características, por um período de tempo mais longo, após seu processamento (SOUSA et al., 2012).

A formação do filme envolve ligações inter e intramoleculares, ou a reticulação das cadeias dos polímeros, formando assim uma rede tridimensional semi-rígida que retém e imobiliza o solvente. O grau de coesão depende da estrutura do polímero, do solvente usado, da temperatura e a presença de outras moléculas, como os plastificantes. Os polímeros obtidos a partir de recursos naturais podem ser melhorados através de mistura com outros compostos, quando as suas propriedades não são aceitáveis (THARANATHAN, 2003). Além da possibilidade de retornarem ao ciclo biológico depois do uso, os filmes biopoliméricos podem ser desenvolvidos a fim de se obter propriedades que satisfaçam as aplicações requeridas, tais como barreira à transferência de massa (vapor de água e gases), transporte de aditivos alimentares (pigmentos, aromas, flavorizantes) e liberação controlada de substâncias ativas (antioxidantes e agentes antimicóticos) (PERESSINI et al., 2003).

### **3.6.1 Obtenção de filmes biodegradáveis pelo método de “*casting*”**

Os filmes podem ser obtidos a partir de uma solução ou dispersão do agente formador de filme, seguido da formação de uma camada fina através de técnicas, como *casting*, extrusão, termoformagem, injeção, sopro, entre outras (GALDEANO et al., 2009).

A técnica de *casting* é amplamente utilizada em estudos de laboratório na elaboração de filmes, por não exigir equipamentos específicos e grandes quantidades de matéria-prima. Esta técnica consiste no espalhamento da solução formadora do filme (macromolécula, água e plastificante) em um suporte, que posteriormente é submetida à secagem para evaporação da água (DENAVI et al., 2009).

### **3.6.2 Plastificantes**

Plastificantes geralmente são moléculas de baixa massa molar e são compostos que podem ser adicionados em filmes poliméricos cuja intenção é melhorar a processabilidade e aumentar a flexibilidade. Estas moléculas interagem com as cadeias poliméricas através de forças intra e intermoleculares (ligações de hidrogênio), diminuem a rigidez do filme e reduzem a viscosidade do sistema. Mesmo alterando as propriedades físico-químicas dos polímeros, os plastificantes não alteram a estrutura do material, no entanto, eles possibilitam o aumento do volume livre das cadeias poliméricas, e em consequência, a mobilidade de macromoléculas (OLIVAS e BARBOSA-CÁNOVAS, 2007; SOTHORNVIT e KROCHTA, 2001).

Como os plastificantes reduzem as interações intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias dos polímeros, há uma diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças, resultando assim em materiais com menores temperaturas de transição vítrea (Tg), menor cristalinidade, menor rigidez, maior flexibilidade e melhor maquinabilidade (VAN SOEST et al., 1996; MÜLLER, 2007; MALI et al., 2006).

A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes deve ser realizada de acordo com a compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizados, isto é, deve ser miscível ao solvente e ao polímero, de forma a evitar a separação prematura no decorrer do processo de secagem, causando uma diminuição na flexibilidade do filme (GUILBERT et al., 1986).

### **3.6.2.1 Glicerol**

O glicerol é um composto orgânico, pertencente à classe dos polióis, é um dos agentes plastificantes mais utilizados na composição de soluções filmogênicas, devido a sua estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas dos biofilmes (CHILLO et al., 2008). É líquido à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Encontra-se presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal na sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido esteárico, oleico, palmítico, láurico formando a molécula de triacilglicerol (BOBBIO E BOBBIO, 2003).

Desde 1949 o glicerol é obtido comercialmente pela síntese do propeno. Consiste na cloração a alta temperatura, com uso de radicais livres como intermediários, para a formação do cloreto de alila, sendo que o mesmo é reagido com ácido hipocloroso (água sanitária) resultando na haloidrina que em tratamento com excesso de base leva ao glicerol. Tal processo atualmente corresponde a 25% da capacidade da produção dos EUA e 12,5% da capacidade mundial, no entanto, muitas unidades produtoras estão sendo desativadas em função da grande oferta de glicerol originadas a partir da produção do biodiesel (MOTA et al., 2009).

O termo “glicerol” aplica-se somente ao composto orgânico puro (>99%) 1,2,3 propanotriol, também conhecido como um álcool trivalente. Já o termo “glicerina” aplica-se aos produtos comerciais purificados normalmente contendo uma quantidade maior que 95% de glicerol. Vários níveis de glicerina estão disponíveis comercialmente,

os quais diferem entre si quanto ao seu conteúdo de glicerol, cor, odor e traços de impurezas (KNOTHE et al., 2006; TACONI, 2007).

De acordo com Larsen (2009), o glicerol tem uma gama de aplicações. É utilizado na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes, antibióticos e antissépticos. É aplicado como emoliente e umectante em cremes dentais, hidratantes para a pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. Amacia e aumenta a flexibilidade das fibras têxteis. É empregado no processamento de tabaco, na composição dos filtros de cigarro e como veículo de aromas, e utilizado também, como lubrificantes de máquinas processadoras de alimentos, na fabricação de tintas e resinas e na fabricação de dinamites.

Desde 1959, o glicerol é reconhecido como uma substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, por isso este foi utilizado no presente estudo. 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 Filmes antimicrobianos**

A crescente demanda por produtos pouco processados com as mesmas garantias de inocuidade do que aqueles tratados por métodos tradicionais de conservação incentivaram os pesquisadores a concentrar a maior parte de seus esforços em estudar novas formas de garantir a segurança alimentar e aumentar a vida-útil de produtos alimentícios (FORTUNY e BELLOSO, 2003).

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 impedir o crescimento e desenvolvimento 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).

Os agentes antimicrobianos alimentares são compostos utilizados para controlar a contaminação microbiana, reduzindo a taxa de crescimento ou inativando os micro-organismos no alimento, mantendo a qualidade e frescor sensorial e nutricional. Tradicionalmente, o principal uso de agentes antimicrobianos em alimentos tem sido a de estender a vida útil e manter a qualidade de inativação de micro-organismos deterioradores (DAVIDSON e HARRISON, 2002).

Como agentes antimicrobianos naturais pode-se citar a lactoferrina, enzimas, óleos essenciais de plantas, óleos essenciais de especiarias, quitosana, porfirinas e metais (LAGARÓN et al., 2012).

### 3.7.1 Óleo essencial de cravo

Os óleos essenciais são substâncias naturais voláteis de origem vegetal, são atrativos ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregados em concentrações relativamente elevadas (PEREIRA et al., 2006). São extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (SÁNCHEZ et al., 2010). Outra característica importante é o aroma intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES et al., 2004).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é devida a sua composição química, principalmente aos compostos fenólicos que exercem seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções (HOLLEY e PATEL, 2005). A capacidade antioxidante, antifúngica e antimicrobiana dos óleos essenciais permite a sua utilização em alimentos, melhorando sua qualidade e beneficiando a saúde humana (HOSSAIN, 2012).

A espécie vegetal *Syzygium aromaticum*, conhecida popularmente como cravo-da-índia, pertence à família das Mirtaceae e é explorada principalmente para extração industrial do óleo essencial obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes (ASCENÇÃO e FILHO, 2012). O cravo-da-índia é a gema floral seca sendo usado principalmente como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol. Nas folhas ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINA et al., 2001) e no cravo também é o principal componente do óleo, variando de 70 a 85% (BROWN e MORRA 1995; BROWN et al., 1991; ORTIZ 1992).

O eugenol, principal constituinte químico presente no cravo apresenta efeitos anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico. É comumente utilizado como

antimicrobiano e antifúngico (GUIMARÃES et al., 2008). Sua obtenção comercial é feita principalmente a partir do cravo. O eugenol também é muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida (CAI e WU 1996; CHONG et al. 1997; KAPLAN et al. 1999, SHAPIRO et al. 1994).

O óleo de cravo-da-índia apresentou acentuada atividade antimicrobiana, quando testado para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes* (diminuindo significativamente a taxa de crescimento) e *Staphylococcus epidermidis* (SCHERER et al., 2009).

### **3.8 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).

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

As bactérias patogênicas causam a maioria dos surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos, não só em número como em frequência, embora outros agentes como os vírus, fungos ou os parasitas também as possam provocar. Devido à sua estrutura muito simples e por serem micro-organismos unicelulares, as bactérias replicam-se muito rapidamente caso encontrem nutrientes, temperatura, pH, umidade e concentração de oxigênio adequados (ALVES, 2012).

Algumas das bactérias que mais causam problemas de contaminação alimentar são a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a *Salmonella Enteritidis*.

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa da família Enterobacteriaceae, não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentativa, em sua maioria móveis (flagelo peritricôicos) e pertence a microbiota entérica de mamíferos e aves. Crescem em

temperaturas de 18 a 44°C sendo 37°C é a temperatura ideal (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Praticamente todos os alimentos (de origem vegetal e/ou animal) que não tenham sido alvo de processamento podem veicular *E. coli*, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos a poluição fecal (ALVES, 2012).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae*, A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *S. aureus*, que está freqüentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos. O *Staphylococcus aureus* é considerado o principal agente etiológico de infecções nosocomiais e comunitárias. Esta bactéria, pertencente ao grupo dos cocos gram-positivos, pode ser facilmente encontrada na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis. (SANTOS, 2007).

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que o *S. aureus* desenvolva-se com facilidade em vários alimentos (Loir et al., 2003; Carmo, 2002).

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).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Matéria-prima para obtenção da proteína recuperada**

Foram utilizados os subprodutos de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), provenientes de indústrias de processamento de pescado da Região da Grande Dourados, os quais foram transportados em caixas térmicas com gelo para o Laboratório de Bioengenharia da UFGD. A obtenção da carne mecanicamente separada de Pintado (CMSP) foi realizada através de um separador mecânico de carne (modelo 694, Baader, Germany).

### **4.2 Obtenção de isolado proteico de Pintado (IPP)**

A matéria-prima utilizada para obtenção do isolado proteico de Pintado foi a carne mecanicamente separada de Pintado (CMSP). A mesma foi homogeneizada com água destilada na proporção 1:9 (p:v) a 5 °C durante 5 minutos utilizando agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil).

Após a etapa de homogeneização foi realizado o processo de solubilização alcalina da proteína. Foi empregado, como agente alcalinizante o hidróxido de sódio (NaOH 1 N), onde o pH de solubilização foi de 11,0 à temperatura constante de 5 °C controlada por banho ultratermostático (QUIMIS, modelo 214 D2, São Paulo, Brasil) durante 20 minutos sob agitação constante com agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil).

Após esta etapa, foi realizada uma primeira centrifugação a 9000xg por 20 minutos em centrífuga (Nova técnica, modelo MA 1815) com o intuito de separar o produto solubilizado em três fases: lipídios, proteínas solúveis e proteínas insolúveis, facilitando a coleta do sobrenadante.

A fase intermediária da centrifugação, correspondente às proteínas solúveis, foi reservada e submetida à precipitação isoelétrica da proteína, utilizando para isto o ácido clorídrico (HCL 1N), o pH foi ajustado em 5,8 a temperatura de 5 °C sob agitação constante com agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil) durante 20 minutos. Logo após foi realizada a segunda centrifugação feita a 9000xg por 20 minutos para separar a fração precipitada, facilitando assim a coleta do precipitado, sendo obtido o isolado proteico.

O isolado proteico de Pintado foi submetido à secagem em estufa de circulação e renovação de ar (modelo MA 035) a 45 °C por 16h e posteriormente foi triturado em

tritador doméstico de facas duplas. O isolado proteico foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado à temperatura ambiente durante todo desenvolvimento do trabalho, sendo utilizado conforme a produção dos filmes.

### **4.3 Caracterização do isolado proteico de Pintado (IPP)**

#### **4.3.1 Composição proximal**

A determinação da composição proximal do IPP foi realizada segundo a metodologia oficial da Associação de Análises Químicas Oficiais (AOAC 2000).

O conteúdo de umidade foi determinado de acordo com o método gravimétrico (nº 950.46) em estufa a 105 °C; o teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (nº 928.08) sendo o teor de proteína bruta obtido, através da multiplicação pelo fator 6,25; o conteúdo de lipídios foi obtido pelo método de Soxhlet (nº 960.39) e cinzas, por método gravimétrico (nº 920.153) em mufla a 500-600 °C. As determinações foram realizadas em triplicata.

#### **4.3.2 Análise da funcionalidade**

##### **4.3.2.1 Solubilidade**

A solubilidade foi determinada de acordo com o método de Chalamaiah et al. (2010) e Tadpitchayangkoon et al., (2010), com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). O cálculo da solubilidade proteica ocorreu como mostrado na Equação 1.

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

##### **4.3.2.2 Capacidade de retenção de água (CRA)**

A capacidade de retenção de água foi determinada segundo o método de REGENSTEIN et al., (1984). A CRA foi dada pela diferença entre o peso da amostra úmida e o peso da amostra seca, sendo os resultados expressos em mL de água/ g proteína, através da Equação 2.

$$\text{CRA} = \frac{\text{Quantidade de água retida (mL)}}{\text{Massa original de proteína (g)}} \quad (2)$$

#### 4.3.2.3 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A capacidade de retenção de óleo foi determinada de acordo com o método descrito por FONKWE e SINGH (1996). O resultado foi expresso como a quantidade de óleo retido (mL) por grama de proteína contida na amostra, através da Equação 3.

$$CRO = \frac{\text{Óleo adicionado} - \text{óleo retido (mL)}}{\text{Massa de proteína (g)}} \quad \dots \quad (3)$$

#### 4.4 Obtenção dos filmes

Os níveis, de concentração de IPP; concentração de glicerol e concentração de OEC foram escolhidos através de testes preliminares e através de levantamento bibliográfico.

**Tabela 1.** Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário 2<sup>3</sup>.

Variáveis Codificadas	IPP(g.100 g <sup>-1</sup> de solução)	G (g.100 g <sup>-1</sup> de IPP)	OEC (g)
-1	1,5	0,37	0,1
0	2	0,6	0,3
1	2,5	0,87	0,5

Onde: IPP: isolado proteico de Pintado; G: glicerol; OEC: óleo essencial de cravo.

Foram utilizados 2 níveis (-1, 0, +1) representando as variáveis codificadas e 3 variáveis independentes (reais): isolado proteico de Pintado (IPP), plastificante glicerol (G) e óleo essencial de cravo (OEC) no preparo da solução filmogênica (SF), que originou os filmes, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário  $2^3$ , com os valores codificados e reais.

<b>Experimentos</b>	<b>IPP (g)</b>	<b>Glicerol (g)</b>	<b>OEC (g)</b>
<b>1</b>	1,5 (-1)	0,37 (-1)	0,1 (-1)
<b>2</b>	2,5 (+1)	0,37 (-1)	0,1 (-1)
<b>3</b>	1,5 (-1)	0,87 (+1)	0,1 (-1)
<b>4</b>	2,5 (+1)	0,87 (+1)	0,1 (-1)
<b>5</b>	1,5 (-1)	0,37 (-1)	0,5 (+1)
<b>6</b>	2,5 (+1)	0,37 (-1)	0,5 (+1)
<b>7</b>	1,5 (-1)	0,87 (+1)	0,5 (+1)
<b>8</b>	2,5 (+1)	0,87 (+1)	0,5 (+1)
<b>9</b>	2,0 (0)	0,60 (0)	0,3 (0)
<b>10</b>	2,0 (0)	0,60 (0)	0,3 (0)
<b>11</b>	2,0 (0)	0,60 (0)	0,3 (0)

Onde: IPP: isolado proteico de Pintado; G: glicerol; OEC: óleo essencial de cravo.

Os filmes foram desenvolvidos pela técnica de *casting*, onde inicialmente o IPP foi disperso em 100mL de água destilada. Esta dispersão aquosa foi mantida em agitador (QUIMIS, modelo Q261M23) por 5 minutos e com temperatura de 40 °C para prévia hidratação do IPP. Posteriormente à hidratação, ajustou-se o pH da dispersão para 11,0 com adição de NaOH 1N utilizando pHmetro de bancada (modelo Marconi PA 200, São Paulo, Brasil) mantendo-se a agitação. Após a completa dissolução do IPP, adicionou-se o glicerol e o óleo essencial de cravo previamente solubilizados em 5mL de água destilada. Posteriormente a temperatura da solução filmogênica foi elevada a 80 °C por 40 minutos com agitação contínua, depois a solução foi filtrada em tecido de algodão e espalhada em placas de Petri, descartáveis e esterilizadas, com diâmetro de 8 cm, as quais foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS 314D 242, São Paulo, Brasil) a  $40\pm 1$  °C por 12 h. Após a secagem, os filmes foram armazenados por 24 h em dessecadores mantidos a  $25\pm 2$  °C e umidade relativa de  $55\pm 2\%$ , controlada usando solução saturada de cloreto de sódio.

## 4.5 Caracterização dos filmes obtidos

### 4.5.1 Opacidade

A opacidade (Y) foi determinada segundo Sobral (2000), através de colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japão). Sendo a opacidade calculada como a relação entre a opacidade do filme sobreposto sobre o padrão preto (Yp) e sobre o padrão branco (Yb), segundo a Equação 4.

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (4)$$

### 4.5.2 Solubilidade em água

A solubilidade em água foi determinada segundo a metodologia de CORTEZ-VEGA et al., (2013).

A solubilidade do filme foi representada pelo total de matéria solúvel dissolvida em água, tendo sido calculada através da Equação 5.

$$S(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

S = solubilidade em água (%);

m<sub>i</sub> = massa seca inicial da amostra (g);

m<sub>f</sub> = massa seca final da amostra (g).

### 4.5.3 Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e a alongação dos filmes foram determinadas, em triplicata, segundo metodologia da ASTM (2000), utilizando texturômetro TA.XTplus (Stable Micro Systems). As amostras foram cortadas em forma de retângulos (80 x 25mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50mm e velocidade de tração de 0,8mm.s<sup>-1</sup>.

A resistência à tração foi determinada através da Equação 6.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad (6)$$

Onde:

RT = resistência à tração (MPa);

Fm = força máxima no momento da ruptura (N);

A = área da secção transversal do filme (m<sup>2</sup>).

A elongação foi calculada utilizando-se a Equação 7.

$$E = \frac{(dr - do)}{do} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

E = elongação (%);

do = separação inicial entre as garras (cm);

dr = separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

#### 4.5.4 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada em triplicata pelo método gravimétrico da ASTM (2000). A permeabilidade ao vapor de água foi calculada através da Equação 8.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t \times A} \cdot \frac{L}{\Delta P} \quad (8)$$

Onde:

PVA = permeabilidade ao vapor de água g.mm/m<sup>2</sup>.d.kPa;

ΔW = ganho de massa pela célula (g);

L = espessura inicial do filme (mm);

t = tempo de armazenamento (dias);

A = área do filme exposta (m<sup>2</sup>);

ΔP = diferença de pressão parcial (kPa).

#### 4.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é a análise de microscopia mais utilizada para avaliar a microestrutura de filmes. A caracterização microscópica dos filmes é importante quando se deseja uma melhor compreensão do seu comportamento (SANTOS, 2004).

As análises da microestrutura dos filmes foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMESUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), através das imagens de microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6060, Japão) operado a 20 kV.

As amostras dos filmes foram colocadas em suportes de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro (Sputter Coater, SCDO50) para melhorar a condutibilidade.

#### **4.5.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A determinação da temperatura de fusão e da variação de entalpia dos filmes foi determinada em calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DSC 60, Osaka, Japão), no Laboratório de Operações Unitárias, no *Campus* Cidade, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As amostras de filmes com cerca de 6-10mg foram hermeticamente seladas em cápsulas de alumínio. A varredura foi realizada de 40 a 200 °C, com uma taxa de 10 °C/minuto e fluxo de nitrogênio de 50 mL/minuto.

#### **4.5.7 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 ( $2\theta$ ), tempo de contagem de 5 s/passos, e com intervalos de medida em  $2\theta$  de 10 a 90 graus. A análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMESUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

#### **4.5.8 Análise microbiológica de filmes de IPP incorporados com óleo essencial de cravo**

Os tratamentos que apresentaram as melhores características foram selecionados e tiveram sua atividade antimicrobiana testada através da técnica de difusão de disco segundo a metodologia do Instituto de Normas de Laboratório Clínico-CLSI (2003), adaptada para produtos naturais.

Os micro-organismos utilizados na verificação da atividade antimicrobiana foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*, cujas cepas foram obtidas do Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial-SENAI.

De um crescimento bacteriano de 24 a 48 horas das culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*, foram inoculadas de três a cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em 10mL de caldo BHI (Caldo infusão cérebro e coração) com auxílio de alça bacteriológica, previamente flambada. A suspensão obtida teve a turvação ajustada por comparação visual à suspensão padrão 0,5 da escala de McFarland. Com o auxílio de uma alça de níquel cromo estéril, a suspensão foi semeada na superfície de uma placa de *petri* contendo ágar Müller-Hinton, em três direções até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo (10 minutos aproximadamente), foram aplicados discos dos filmes selecionados, com 15 mm de diâmetro sobre as placas. As leituras foram realizadas, após 18 a 24 horas de incubação a 35-37°C, por meio da medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros de diâmetro com um paquímetro. Uma amostra controle de filme foi utilizada sendo que este filme foi elaborado somente com a proteína recuperada e glicerol, na qual neste trabalho damos o nome de branco

#### **4.6 Análise estatística**

As avaliações foram realizadas em triplicata, sendo os resultados apresentados pela média. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Statistica 7.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização da proteína recuperada

#### 5.1.1 Composição proximal

Os teores de lipídios, proteínas e de umidade apresentaram diferença significativa entre as amostras de CMS e as amostras de isolado proteico, foi observado que a quantidade de proteínas do IPP é praticamente o dobro do valor encontrado na matéria-prima. O elevado valor proteico encontrado na matéria-prima indica que o processo de concentração da proteína utilizado, foi realizado de maneira adequada sendo uma possível alternativa para agregar valor aos resíduos oriundos da indústria pesqueira.

A Tabela 3 apresenta a composição proximal da carne mecanicamente separada de Pintado e do isolado proteico de Pintado.

**Tabela 3.** Composição proximal da carne mecanicamente separada de Pintado e do isolado proteico de Pintado.

Componente	CMSP		Isolado Proteico	
	%(b.u)*	%(b.s.)*	%(b.u)*	%(b.s.)*
Umidade	73,98±1,34	-	5,61±0,01	-
Proteínas	15,84±0,18	56,85±0,18	90,82±0,8	95,21±0,8
Lipídios	10,31±1,16	37,00±1,16	2,92±0,08	3,06±0,08
Cinzas	1,71±0,02	6,13±0,02	1,64±0,06	1,71±0,06

\*Média de 3 repetições ± desvio padrão; CMSP: carne mecanicamente separada de Pintado; b.u.: base umida, b.s.: base seca.

O isolado proteico obtido apresentou reduzido conteúdo lipídico, quando comparado à CMSP, visto que a maior parte dos lipídios foi separada junto com a fração das proteínas insolúveis durante a primeira centrifugação, estes componentes são separados pela diferença de densidade e solubilidade durante a centrifugação, associada a temperatura de solubilização (5 °C) que contribui para a separação da camada de

gordura. (KRISTINSSON et al., 2005). A redução de lipídios é muito importante para diminuir a susceptibilidade do isolado proteico à oxidação lipídica (NOLSOE e UNDELAND, 2009). Pesquisas realizadas por Undeland et al. (2002) também demonstraram a eficácia dos processos de solubilização ácida e alcalina na remoção de lipídios.

Conforme observado na Tabela 3 o teor proteico do isolado foi de 95,21% (b.s.), sendo que este valor está acima do encontrado por Martins et al. (2009), em resíduos de corvina que foi de 77,98%. Freitas (2011), encontrou valor inferior ao obtido neste estudo, sendo de 93,11% (em base seca) para isolado proteico de resíduos de corvina. Camilo et al. (2010) encontraram valores de proteínas e lipídios inferiores ao do presente estudo, sendo de 46,26% (b.s.) de proteínas e 41,23% (b.s.) de lipídios na CMSP; no concentrado proteico o teor foi de 88,79% (b.s.) de proteínas e 4,61% (b.s.) de lipídios.

Apesar da carne mecanicamente separada de Pintado conter um quantitativo maior de elementos orgânicos, o teor de cinzas em base úmida não diferiu muito do valor encontrado no IPP, sendo respectivamente de 1,71% e 1,64%, isso pode ser explicado pelo acúmulo de soluções inorgânicas utilizadas para o ajuste de pH durante o processo de extração do isolado proteico (TADPITCHAYANGKOON e YONGSAWATDIGUL, 2009; FONTANA et al., 2009). Essa pequena diferença no teor de cinzas entre a CMS e o isolado proteico de corvina também foi encontrada por Cortez-Vega (2011), sendo os valores de 1,19% e 1,29 % respectivamente.

A umidade representa um dos fatores críticos no processo de obtenção do isolado proteico, na composição proximal obtida comparada com Camilo et al. (2010) verificou-se que na carne mecanicamente separada de Pintado foi encontrado um teor de umidade semelhante e no isolado um teor maior ao apresentado neste estudo, que foi respectivamente de 74,54% e 8,48%. Um índice de umidade baixo é favorável ao processo de obtenção de produtos a base de isolado, visto que formará um gel com maior qualidade, o que se refletirá numa maior força do gel (CAMILO et al. 2010).

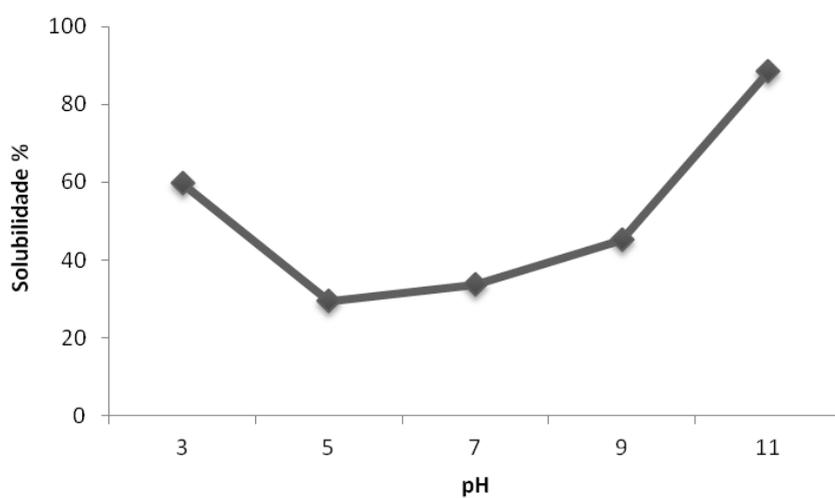
## **5.1.2 Análise de funcionalidade**

### **5.1.2.1 Solubilidade**

A Figura 2 apresenta a solubilidade do isolado proteico de Pintado em função do pH.

Observou-se uma baixa solubilidade no pH próximo do ponto isoelétrico das proteínas (29,47%) e a maior solubilidade (88,5%) foi atingida em pH extremo de 11,0. Fontana (2009) encontrou valores superiores ao do presente estudo em concentrados proteicos de resíduos de corvina, porém a baixa solubilidade das proteínas também ocorreu próximo ao ponto isoelétrico (32,5% pH 5,0) e uma elevada solubilização proteica em pH extremo (97,5% em pH 11,0).

**Figura 2.** Solubilidade do IPP em função do pH



A baixa solubilidade da proteína é causada pela desnaturação da proteína, induzida pelo processo de alteração do pH (RAWDKUEN et al., 2009). As proteínas geralmente exibem sua solubilidade mínima em seu ponto isoelétrico, onde ocorre um aumento entre a interação proteína-proteína, pois as forças eletrostáticas das moléculas são mínimas, e menos água interage com as moléculas de proteína (FREITAS, 2011). Já a alta solubilidade da proteína ocorre porque à medida que o pH se torna mais alcalino, há predominância de cargas negativas, havendo interação mais forte das moléculas de proteína com a água e, também, maior repulsão entre as moléculas de proteína, aumentando significativamente a solubilidade (FONTANA et al., 2009).

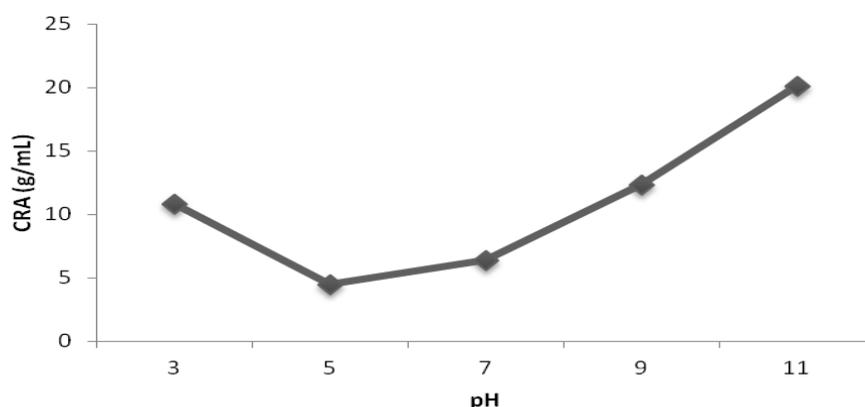
Segundo Pacheco e Sgarbieri (2002), a solubilidade é uma das mais importantes propriedades das proteínas e varia consideravelmente em função do pH e da força iônica. Resultados similares foram relatados para outras espécies de pescado, como os de sardinha, bagre e também corvina (FONTANA et al., 2009).

A alta solubilidade da proteína recuperada indica potenciais aplicações em alimentos formulados, proporcionando uma aparência atrativa e uma sensação agradável no produto preparado (SATHIVEL et al., 2004).

### 5.1.2.2 Determinação da capacidade de retenção de água (CRA)

A Figura 3 apresenta as curvas da CRA em função do pH do isolado proteico de Pintado. Observa-se que, a capacidade de retenção de água apresentou o mesmo perfil proteico que a solubilidade, visto que aumentou em pH 3,0 (10,8mL), apresentou decréscimo em pH 5,0 (4,45mL) e novamente aumentou em pH 7,0 (6,37mL) e 9,0 (12,33mL), sendo em 11,0 o maior valor obtido (20,11mL).

**Figura 3.** Capacidade de retenção de água (CRA) do isolado proteico de Pintado



Como esperado, a CRA medida em pH 5,0 foi inferior à obtida nos demais valores de pH, pois de acordo com Kinsella (1987) ocorreu a diminuição da capacidade da proteína em se ligar com a água, devido às interações intermoleculares e formação de grandes aglomerados proteicos e pode ainda ser afetada por outras propriedades, como a solubilidade.

Fontana et al. (2009), obtiveram valores máximos de 21,9 e 22,9 mL água/g proteína, em pH 11,0 para isolados proteicos de corvina obtidos pelo processo de solubilização ácido e alcalino, respectivamente. Sendo os valores encontrados semelhantes ao do presente trabalho.

Em pHs afastados do ponto isoelétrico das proteínas, a predominância de cargas de mesmo sinal provoca repulsão e afastamento entre as moléculas, deixando maior espaço para ser preenchido pelas moléculas de água aumentando, portanto, a capacidade de retenção de água. Em pHs abaixo de 5,0 e acima de 7,0, as moléculas de água se

combinam com os grupos polares das proteínas e a CRA tende a aumentar (PACHECO e SGARBIERI, 2002).

A capacidade de retenção de água é um fenômeno importante em alimentos, pois a água absorvida em pequenas quantidades não atua como solvente, mas contribui para aumentar a viscosidade (CÂNDIDO et al., 1998).

### **5.1.2.3 Determinação da capacidade de retenção de óleo (CRO)**

A CRO média obtida foi de  $2,03 \pm 0,06$  (mL óleo/g proteína) sendo o valor obtido inferior ao encontrado por Ferreira (2014) que foi de  $3,17 \pm 0,11$  (mL óleo/g proteína), em CMS de corvina. Freitas et al. (2011), também encontrou valores superiores a este estudo ao avaliarem a CRO em isolado proteico obtido de resíduos de anchoita (*Engraulis anchoita*), obtendo um valor de  $7,27 \pm 0,64$  mL óleo/g proteína.

O baixo valor encontrado no presente estudo indica baixa hidrofobicidade do isolado proteico, pois quando há grande quantidade de regiões hidrofóbicas nas proteínas há favorecimento de interações destas com o óleo (CHEFTEL, CUQ e LORIENT, 1993). De acordo com Fontana et al. (2009), a retenção de óleo varia em função do número de grupos hidrofóbicos expostos das proteínas e provavelmente, as cadeias não polares das proteínas possuem afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de óleo, contribuindo para absorção do óleo.

O mecanismo de retenção de óleo deve-se principalmente à captura física do óleo pela proteína e é uma característica funcional muito importante, requerida principalmente pela indústria alimentícia de carne e produtos emulsionados (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

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).

## **5.2 Obtenção e caracterização do filme**

### **5.2.1 Planejamento experimental**

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos pelos filmes de proteína de Pintado, correspondente a cada experimento, em relação às variáveis dependentes analisadas.

**Tabela 4.** Valores obtidos pelos filmes de proteína de Pintado, correspondente a cada experimento, em relação às variáveis dependentes analisadas.

Experimentos	O (%)	S (%)	PVA (g.mm/(kPa.d.m2)	RT(MPa)	E%
1	14,94±0,1	30,10±0,01	6,05±1,5	3,92±0,5	23,38±0,7
2	19,60±1,9	25,55±0,01	5,72±1,1	4,04±1,0	14,40±1,7
3	14,06±0,8	44,90±0,04	9,0±1,2	0,55±0,09	44,39±1,9
4	17,50±1,8	37,03±0,04	9,33±1,0	1,76±0,3	23,71±0,2
5	18,62±0,7	29,57±0,02	4,32±1,2	1,27±0,4	16,28±0,7
6	23,93±0,8	22,05±0,04	5,16±1,0	6,70±0,4	10,40±1,0
7	17,26±0,5	33,73±0,05	8,93±1,6	2,00±1,7	27,00±0,3
8	20,70±1,9	30,71±0,03	8,77±1,7	1,49±0,2	17,75±1,0
9	15,94±1,7	33,82±0,03	4,62±1,1	1,18±0,3	16,53±0,26
10	15,80±1,7	26,19±0,03	7,48±1,2	1,14±0,4	15,70±1,5
11	16,44±1,7	33,81±0,04	6,94±1,6	1,11±0,3	16,19±0,5

\*Média de 3 repetições ± desvio padrão. Onde: O: Opacidade; S: solubilidade; PVA: Permeabilidade ao Vapor de Água; RT: Resistência à Tração e E: Elongação.

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para a variável opacidade.

**Tabela 5.** Verificação da validade estatística do modelo para opacidade.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
Regressão	61,27	2	30,63	12,15	4,46
Resíduo	20,16	8	2,52		
Total	81,43	10			

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F:Fisher.

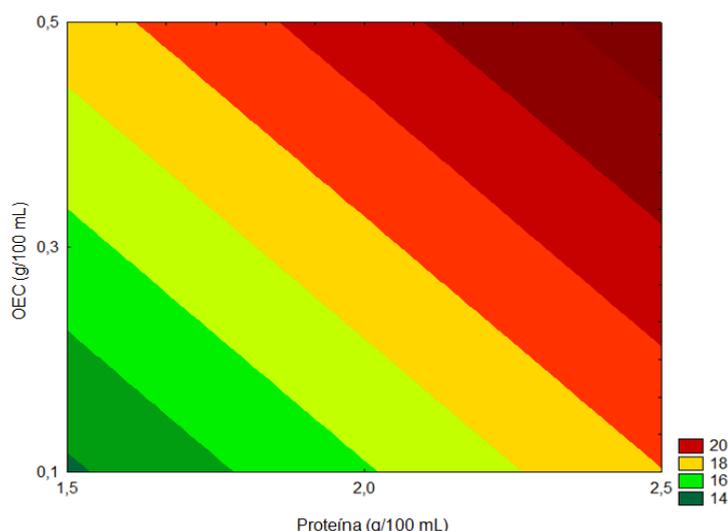
Segundo a Tabela 5 podemos observar que o modelo foi significativo, porém não é preditivo, pois a superioridade do  $F_{\text{calculado}}$  não foi 5 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (Gacula e Singh, 1984).

O ajuste do modelo também foi expresso pelo coeficiente de correlação  $R^2$  que foi de 0,75, indicando que 75% da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo de regressão obtido para a opacidade de filmes de IPP incorporados com óleo essencial mostrado pela Equação 9.

$$\text{Opacidade} = 17,74 + 4,12P + 3,68\text{OEC} \quad (9)$$

A superfície de contorno demonstrada na Figura 4 destaca um aumento na opacidade dos filmes em maiores concentrações de proteína e óleo essencial de cravo. Halal (2012) também encontrou um nível mais elevado de opacidade em filmes com mais óleo de palma e isolado proteico de corvina em sua composição, sendo de 16% o teor de opacidade dos filmes com 20% óleo de palma e 4,5g de proteína e aproximadamente 14% em filmes com 10% de óleo de palma e 4,0g de proteína. Outros autores, também observaram uma maior opacidade em filmes de proteína adicionados de lipídeos, como Rhim et al. (2002), em filmes de isolado proteico de soja incorporados de ácidos graxos e Ozdemir e Floros (2008) em filmes proteicos de soro de leite com adição de cera de abelha.

**Figura 4.** Superfície de contorno para opacidade em relação as concentrações de proteína e óleo essencial de cravo.



Neste estudo observou-se uma maior opacidade nos experimentos 6 (23,93%) e 8 (20,70%), os quais apresentam maiores valores de IPP e antimicrobianos em sua composição, o experimento 3 resultou no filme com o menor valor de opacidade, e sua

formulação contém o menor teor de proteína e óleo, esses resultados evidenciam que tanto a concentração de IPP como a quantidade de óleos essenciais influem na coloração, provavelmente devido a pigmentação característica desses elementos.

Segundo Chen (1995), a opacidade do filme é consequência da morfologia ou da estrutura química relacionada à massa do material. Os filmes opacos dificultam a transmissão de luz, o que pode ser uma característica desejada, quando a luz é um fator de deterioração do produto embalado. No entanto, a transparência é uma característica importante em algumas aplicações, como em embalagens de alimentos (FURTADO, 2013).

Valores similares aos obtidos no presente estudo foram encontrados por Ferreira (2014) em relação a opacidade, quando este autor trabalhou com óleo de orégano e de cravo, sendo que a opacidade variou entre 14,99% a 23,33%.

A Tabela 6 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequabilidade do modelo para a variável solubilidade.

Para solubilidade como demonstrado na Tabela 6, o F calculado (10,48) foi maior que o F tabelado (4,35), isso demonstra que o modelo encontrado é significativo, porém não preditivo.

**Tabela 6.** Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
<b>Regressão</b>	314,88	3	104,96	10,48	4,35
<b>Resíduo</b>	70,07	7	10,01		
<b>Total</b>	384,95	10			

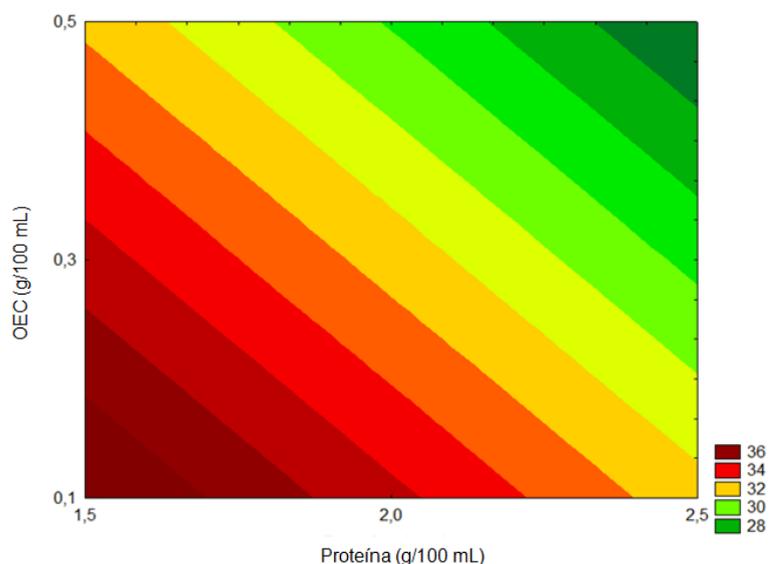
Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F:Fisher.

O ajuste do modelo também foi expresso pelo coeficiente de correlação  $R^2$  que foi de 0,81, indicando que 81% da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo de regressão obtido para a solubilidade de filmes de IPP incorporados com óleo essencial mostrado pela Equação 10.

$$\text{Solubilidade} = 31,58 - 5,74P + 9,77G - 5,38\text{OEC} \quad (10)$$

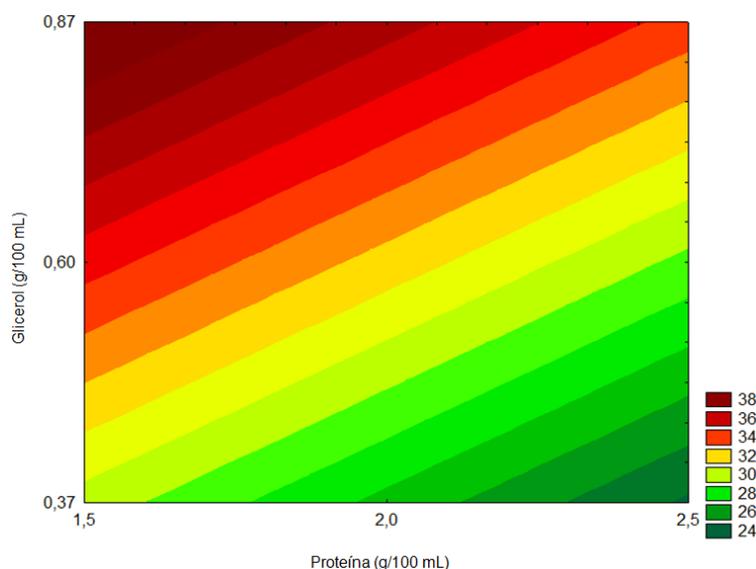
As Figuras 5 e 6 demonstram que a solubilidade foi influenciada pelas variáveis proteína, glicerol e OEC, a característica hidrofílica do plastificante contribuiu para um aumento na solubilidade dos filmes com maiores concentrações de glicerol.

**Figura 5.** Superfície de contorno para solubilidade em relação as concentrações de proteína e óleo essencial de cravo.



Como observado na Tabela 4, a solubilidade dos filmes variou de 22,05% (experimento 6) a 44,90% (experimento 3), e estes foram menos solúveis do que os filmes proteicos de anchoita adicionados de diferentes agentes antimicrobianos que apresentaram solubilidades de 27,7 a 65,3% (ROCHA, 2012). Os filmes também apresentaram menor solubilidade em água do que os biofilmes de isolado proteico de corvina com adição de óleo de palma, que apresentaram solubilidades de 28,3 a 47,2% (HALAL 2012).

**Figura 6.** Superfície de contorno para solubilidade em relação as concentrações de proteína e glicerol.



São os componentes da estrutura dos filmes que determinam sua solubilidade, a baixa taxa de dissolução dos filmes produzidos no presente estudo evidencia que houve baixa hidrofiliicidade proteica ocasionando uma alta coesão da matriz, pois para que ocorra a dissolução de um polímero hidrofílico é necessário a penetração ou difusão da água em seu interior e inchaço devido à ruptura das cadeias e relaxamento do polímero (TURHAN e AHBAZ 2004). Proteínas com alta massa molecular são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água. Essas moléculas são interessantes, uma vez que podem formar filmes resistentes à água, além disso, a solubilidade das proteínas depende muito do número e do arranjo de cargas na molécula, que dependerá da composição de aminoácidos (SGARBIERI, 1996).

Bourtoom et al. (2006), avaliaram o efeito do tipo de plastificante e concentração nas propriedades de filme comestível obtidos a partir de proteínas solúveis em água de surimi de pescado. Estes autores concluíram que filmes plastificados com sorbitol, mostraram maior solubilidade em comparação com filmes plastificados com glicerol e polietileno glicol. O aumento da concentração do plastificante, em geral, resultou em filmes mais solúveis, os valores apresentaram em torno de 55% de solubilidade, estando acima dos resultados encontrados no presente trabalho.

A concentração de OEC também foi um fator interferente na solubilidade dos filmes, como demonstra a Figura 5 é na menor concentração de OEC (0,1 g/100mL) onde obtêm-se a maior solubilidade proteica, ou seja, quanto menos óleo maior a solubilização da matriz polimérica. Essa característica provavelmente está relacionada a

natureza hidrofóbica do óleo essencial de cravo. Oliveira (2013), também encontrou em seu estudo sobre filme de proteína de soro de leite adicionado com óleo de orégano maior solubilidade em filmes com menor teor de óleo em sua composição, sendo de 17,01% em filmes com 1% do óleo e 14% com 1,5% de óleo. A incorporação de um composto hidrofóbico na formulação de filmes proteicos reduz a capacidade da matriz formadora de filme para ligar-se com moléculas de água (MCHUGH e KROCHTA, 1994).

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para a variável permeabilidade ao vapor de água.

**Tabela 7.** Verificação da validade estatística do modelo para permeabilidade ao vapor de água.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
<b>Regressão</b>	27,31	1	27,31	31,03	5,12
<b>Resíduo</b>	7,94	9	0,88		
<b>Total</b>	35,25	10			

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Como demonstrado na Tabela 7 o modelo encontrado é significativo e preditivo, pois a superioridade do  $F_{\text{calculado}}$  foi 5 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ .

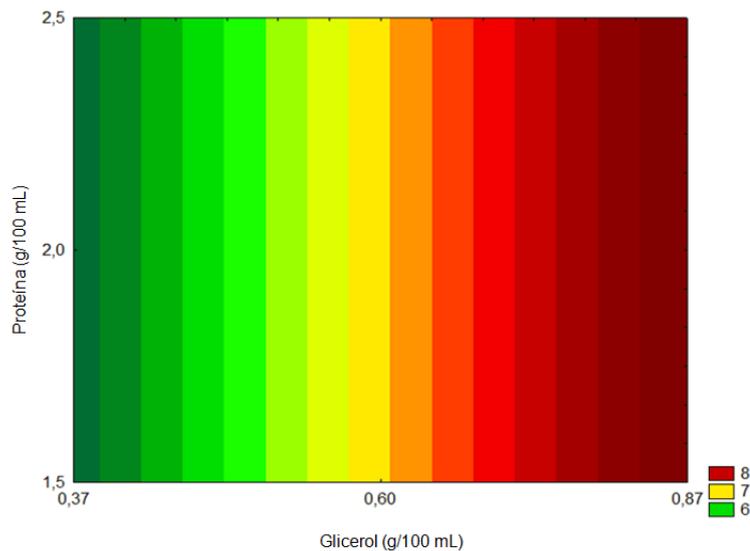
O ajuste do modelo também foi expresso pelo coeficiente de correlação  $R^2$  que foi de 0,77, indicando que 77% da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo de regressão obtido para a permeabilidade ao vapor de água de filmes de IPP incorporado com óleo essencial mostrado pela Equação 11.

$$\text{Permeabilidade ao Vapor de água} = 6,93 + 3,69G \quad (11)$$

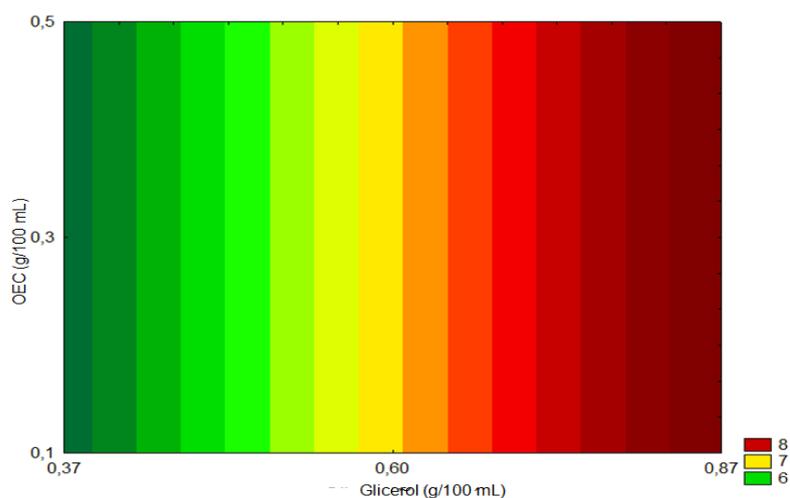
Como observado nas Figuras 7 e 8 a permeabilidade dos filmes é maior em elevadas concentrações de plastificante independentemente dos teores de proteína e OEC. O aumento da permeabilidade ao vapor de água com o aumento da concentração de plastificante higroscópico é comum em biofilmes (SOBRAL e OCUNO, 2000).

Filmes obtidos de proteínas miofibrilares possuem alta absorvidade de água e permeabilidade ao vapor de água, devido à hidroflicidade de aminoácidos em moléculas de proteínas e às quantidades significativas de plastificantes hidrofílicos, como o glicerol e o sorbitol (PRODPRAN, BENJAKUL e ARTHAN, 2007).

**Figura 7.** Superfície de contorno para permeabilidade ao vapor de água em relação as concentrações de glicerol e proteína.



**Figura 8.** Superfície de contorno para permeabilidade ao vapor de água em relação as concentrações de glicerol e óleo essencial de cravo.



Bourtoom et al. (2006) em seu estudo sobre filmes de proteínas solúveis de surimi de pescado, também detectou o aumento da permeabilidade ao vapor de água com o incremento na quantidade de plastificante nos filmes. A PVA aumentou de 30,41

para 79,96; 125,80 para 234,67 e 89,52 para 225,45 g.mm /kPa.dia.m<sup>2</sup> quando a concentração de sorbitol, glicerol e polietileno glicol aumentou de 25% para 75% respectivamente.

Gontard et al. (1994), explicam que a distribuição dos lipídios na matriz estrutural da proteína pode ser prejudicada, possibilitando a formação de zonas com maior concentração do componente apolar, o qual pode proporcionar o aparecimento de rachaduras e canais preferenciais, através dos quais a água difunde-se pela matriz. Fato este que ter ocorrido no presente trabalho, outro fator que provavelmente ocorreu é que o óleo essencial de cravo não conseguiu se ligar quimicamente à matriz proteica, deixando espaços vazios pelos quais a água pode permear na matriz filmogênica, impedindo assim que os filmes com maiores teores de óleo apresentassem menor PVA.

Resultados diferentes a este estudo foram verificados em filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de *Melaleuca arternifolia* (árvore do chá) e incorporados com óleo de orégano, onde ocorreu uma redução da permeabilidade do vapor de água, atribuindo este fato ao aumento da fração hidrofóbica na formação do filme (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2010; ZIVANOVIC et al., 2005). Bourtoom e Chinnan (2009) analisaram a influência da adição de óleo de palma, em diferentes concentrações nos filmes de quitosana e amido de arroz, e também observaram a redução da PVA.

As propriedades mecânicas dos filmes dependem das interações entre os componentes, ou seja, da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias (CALLEGARIN et al., 1997). A homogeneização do lipídio na solução proteica também é uma etapa muito importante, pois o diâmetro dos glóbulos lipídicos e sua distribuição homogênea na matriz polimérica estão diretamente relacionados com a resistência à tração e com a porcentagem de alongação, sendo que quanto menor o diâmetro mais homogênea a distribuição, formando-se filmes com uma matriz mais contínua, regular e estável (DEBEAUFORT e VOILLEY, 1997).

As Tabelas 8 e 9 apresentam os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para as propriedades mecânicas de resistência à tração e alongação.

**Tabela 8.** Verificação da validade estatística do modelo para resistência à tração.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
Regressão	22,61	6	3,76	1,3	6,16
Resíduo	11,57	4	2,89		
Total	34,18	10			

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F:Fisher.

Como demonstrado na Tabela 8, o  $F_{\text{calculado}}$  (1,30) foi menor que o  $F_{\text{tabelado}}$  (6,16), portanto o modelo encontrado não é significativo nem preditivo, não sendo possível gerar superfície de contorno para resistência à tração.

**Tabela 9.** Verificação da validade estatística do modelo para resistência à elongação.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
Regressão	691,82	3	230,6	9,98	4,35
Resíduo	161,72	7	23,1		
Total	853,54	10			

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F:Fisher.

Como demonstrado na Tabela 9, o modelo encontrado é significativo, porém não foi preditivo.

O ajuste do modelo também foi expresso pelo coeficiente de correlação  $R^2$  que foi de 0,81, indicando que 81% da variabilidade na resposta podem ser explicados pelo modelo de regressão obtido para a resistência à elongação de filmes de IPP incorporado com óleo essencial mostrado pela Equação 12.

$$\text{Resistência à Elongação} = 20,52 - 11,19P + 12,09G - 8,61OEC \quad (12)$$

Apesar da análise de resistência à tração não ter gerado resultados significativamente estatísticos, houve uma considerável interação entre a proteína e o glicerol. Em biofilmes com alta concentração de IPP e baixo teor de plastificante a resistência obtida foi maior, esse comportamento pode ser observado na Tabela 4, a qual mostra que a resistência à tração variou de 0,55 MPa no experimento 3 (composto por 35% de glicerol, 1,5g de IPP e 0,1g OEC ) para 6,70 MPa no experimento 6 (composto por 25% de glicerol, 2,5g. de IPP e 0,5g de OEC).

Um dos fatores mais importantes que afeta sensivelmente as propriedades de tração é o teor de plastificante, especialmente aqueles que mostraram comportamento hidrofílico, como o glicerol. Sabe-se que os plastificantes provocam alteração nas propriedades mecânicas, fazendo com que tenham maior flexibilidade e menor resistência à tração (ARAUJO-FARRO, 2008).

Segundo Perez-Gago e Krochta (2001) quanto maior a concentração de proteína nos filmes, maior será a quantidade de grupos sulfídricos, promovendo um maior número de ligações covalentes S-S na matriz filmogênica, e conseqüentemente formando filmes mais resistentes. A redução da força e o aumento da elongação na ruptura com o aumento do plastificante são comportamentos típicos dos biofilmes (Gontard,1991; Cuq et al., 1995; Parris et al., 1995). A presença de plastificantes diminui a densidade das interações proteína-proteína aumentando a mobilidade das cadeias polipeptídicas e tornando os filmes menos resistentes e mais deformáveis (Cuq, 1996).

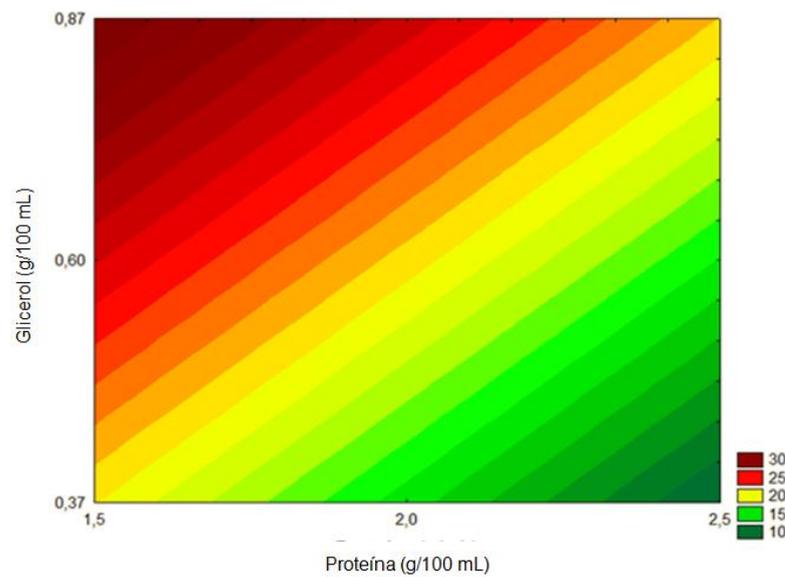
Outros autores também relataram a variação da resistência à tração em função do glicerol. Jongjareonrk et al. (2006) observaram uma diminuição na resistência do filme de gelatina de pele de lubina amarela (*Priacanthus macracanthus*) e de lubina vermelha (*Lutjanus vitta*), quando o conteúdo de glicerol aumentou de 25 para 75% (à base de proteína). Guerrero et al. (2010) estudaram a resistência à tração dos filmes de proteína de soja com diferentes concentrações de glicerol e observaram uma redução de 112,4 para 12,4 MPa nos filmes com 30% e 50% de glicerol/100g de proteína, respectivamente. Tanadu-Palmu e Grosso (2002) estudaram filmes de proteína de trigo plastificados com diferentes concentrações de glicerol e também observaram uma maior resistência à tração quando uma menor concentração de glicerol foi utilizada.

Segundo Debeaufort e Voilley (1997), um filme com estrutura heterogênea apresenta descontinuidades na rede o que aumenta a fragilidade do filme, devido a

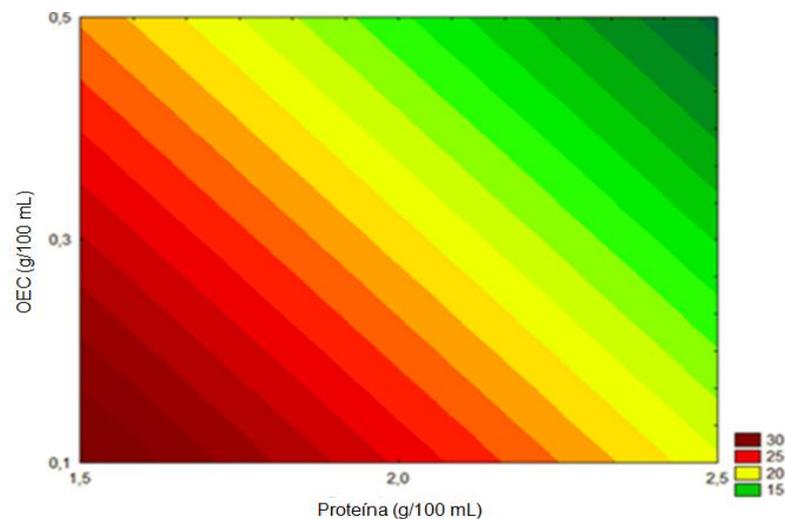
pontos preferenciais de quebra, diminuindo a resistência à tração, fato que pode ter ocorrido neste trabalho devido aos baixos valores de resistência à tração encontrados.

Como mostrado na Tabela 4 a resistência à elongação variou de 10,40% no a 44,39%, sendo que houve uma significativa interação entre o plastificante, a proteína e OEC sobre a flexibilidade dos filmes, pois com o aumento na concentração de glicerol e redução no teor das outras variáveis a elasticidade aumentou. Esse comportamento pode ser confirmado com as superfícies de contorno apresentadas nas Figuras 9,10 e 11.

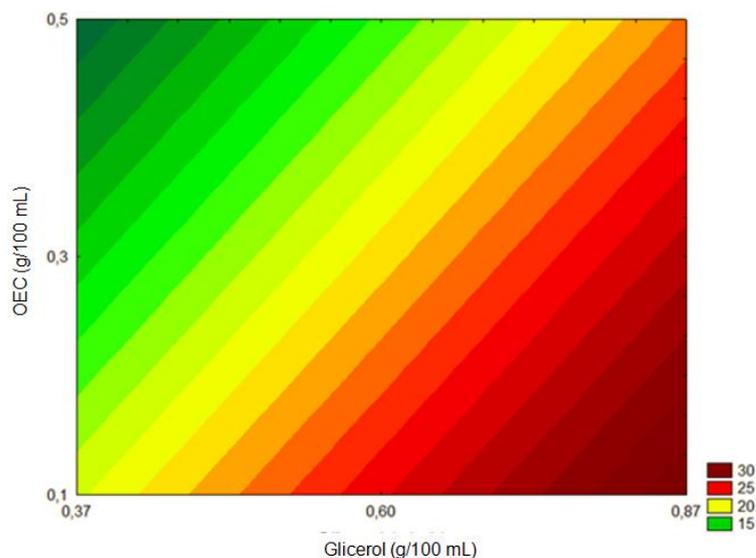
**Figura 9.** Superfície de contorno para resistência à elongação em relação as concentrações de proteína e glicerol.



**Figura 10.** Superfície de contorno para resistência à elongação em relação as concentrações de proteína e óleo essencial de cravo.



**Figura 11.** Superfície de contorno para resistência à elongação em relação as concentrações de glicerol e óleo essencial de cravo.



O aumento da elongação na ruptura como consequência do aumento da concentração do plastificante é um clássico comportamento dos filmes (PASCHOALICK et al., 2003; CHIRITA, 2008). De acordo com GALIETTA et al. (1998), as mudanças na propriedade de elongação caracterizam modificações na organização tridimensional, decrescendo a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares ocorridas na rede proteica formadora do filme, com o aumento do volume vazio e da mobilidade da cadeia.

As Figuras 10 e 11 evidenciam que com o aumento da quantidade de OEC ocorreu uma redução na elongação dos biofilmes. Peroval et. al. (2002) também observaram uma redução da elongação dos filmes de arabinosilana ao incorporar ácidos graxos nestes. Os mesmos autores relataram que alguns lipídios são incapazes de formar uma matriz contínua e coesa, causando assim, uma menor elongação. Provavelmente a incorporação de óleo de cravo na solução filmogênica provocou uma desestabilização da matriz gerando filmes com menor elasticidade.

### 5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 12 apresenta a microscopia eletrônica de varredura para os filmes de isolado proteico de Pintado sem e com incorporação de óleo essencial de cravo, respectivamente.

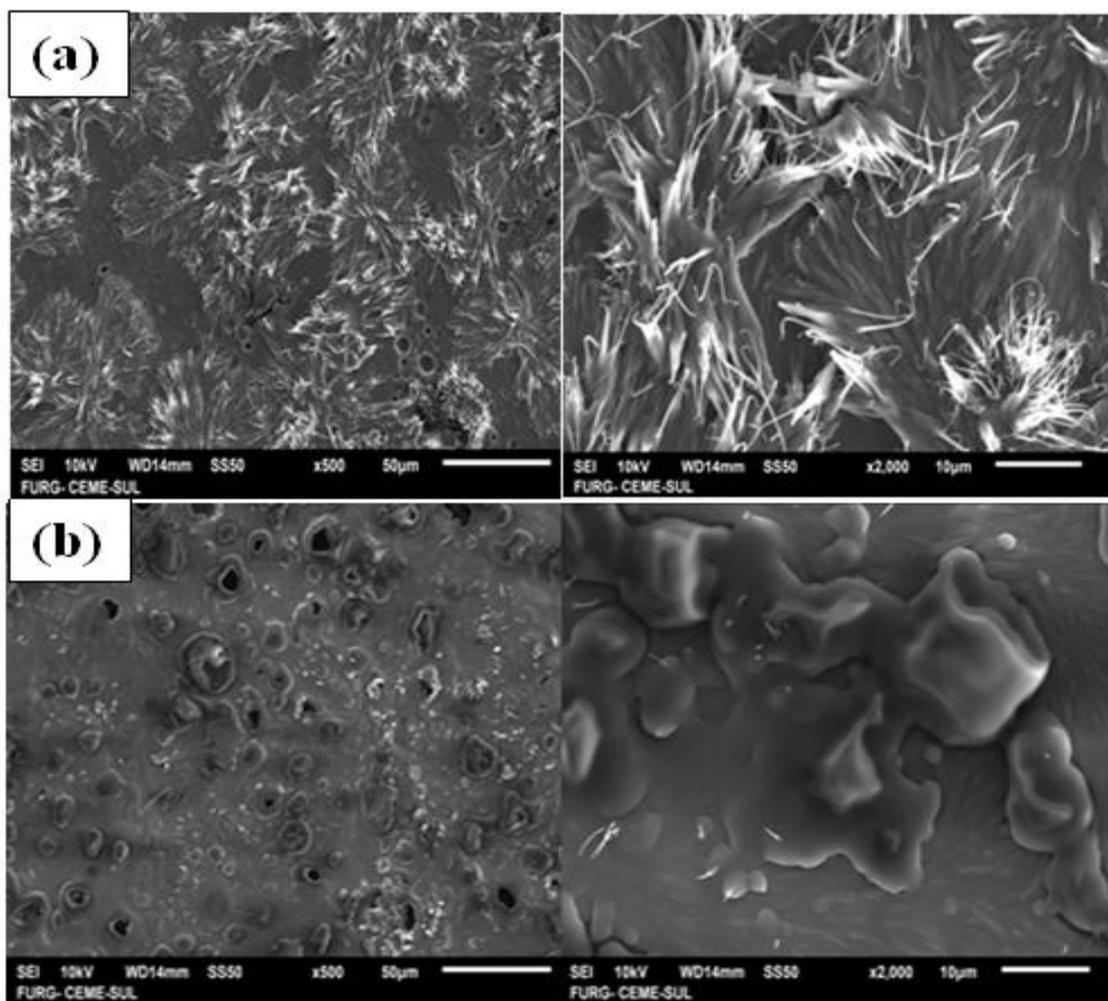
É importante destacar que a morfologia das partículas foi supostamente afetada pela incorporação do óleo essencial de cravo, conforme pode ser observado na Figura 12 (a) o tratamento controle que não possui OEC, além de muitas irregularidades superficiais (depressões e pequenos orifícios), apresentou também um notório desenvolvimento microbiano, que além de deteriorar o filme interferiu na visualização da microestrutura de superfície. Já no tratamento com OEC pode ser observado muitas descontinuidades estruturais (superfície menos lisa, com imperfeições, proteínas não solubilizadas e orifícios), porém não é possível verificar micro-organismos em sua estrutura.

Wang et al. (2009) produziram filmes de gelatina e óleo de milho, e também constataram superfícies mais regulares nos filmes incorporados com óleo essencial.

Apesar do tratamento 6 apresentar micro-orifícios, possivelmente ocasionados pela rápida evaporação do óleo essencial de cravo durante o processo de secagem, estes não foram suficientes para facilitar a difusão do vapor de água nos filmes, uma vez que este filme foi um dos menos permeáveis ao vapor de água quando comparado com os demais (Tabela 4).

SOUZA et al. (2011), ao estudarem filmes biopoliméricos de quitosana incorporados com diferentes óleos, verificaram que os filmes incorporados com óleo de arroz ou ácido esteárico obtiveram superfícies irregulares, atribuindo este fato à separação de fases ou maior tensão de superfície que resultou em maiores descontinuidades na estrutura dos filmes.

**Figura 12. Microestrutura eletrônica de varredura dos filmes**



Onde: (a) referente ao tratamento branco (2,5 g de IPP e 0,37 g de glicerol) e (b) filme referente ao tratamento 6 (2,5 g de IPP, 0,37 g de glicerol, 0,5 g de OEC). Foi utilizada uma ampliação de X500 e X2000 em ambas as amostras.

### 5.2.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Conforme Bandeira (2013), a análise de DSC mede as temperaturas e o fluxo de calor associados com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo, e fornecem informações sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos, como transições de fase, desidratações, reduções e algumas reações de decomposição, e exotérmicos, como cristalização, oxidação, reações de decomposição, ou mudanças na capacidade calorífica.

De acordo com a Figura 13, para o tratamento branco (2,5g de IPP e 0,37g de G) observa-se as seguintes características: temperatura inicial da reação próxima a 28°C,

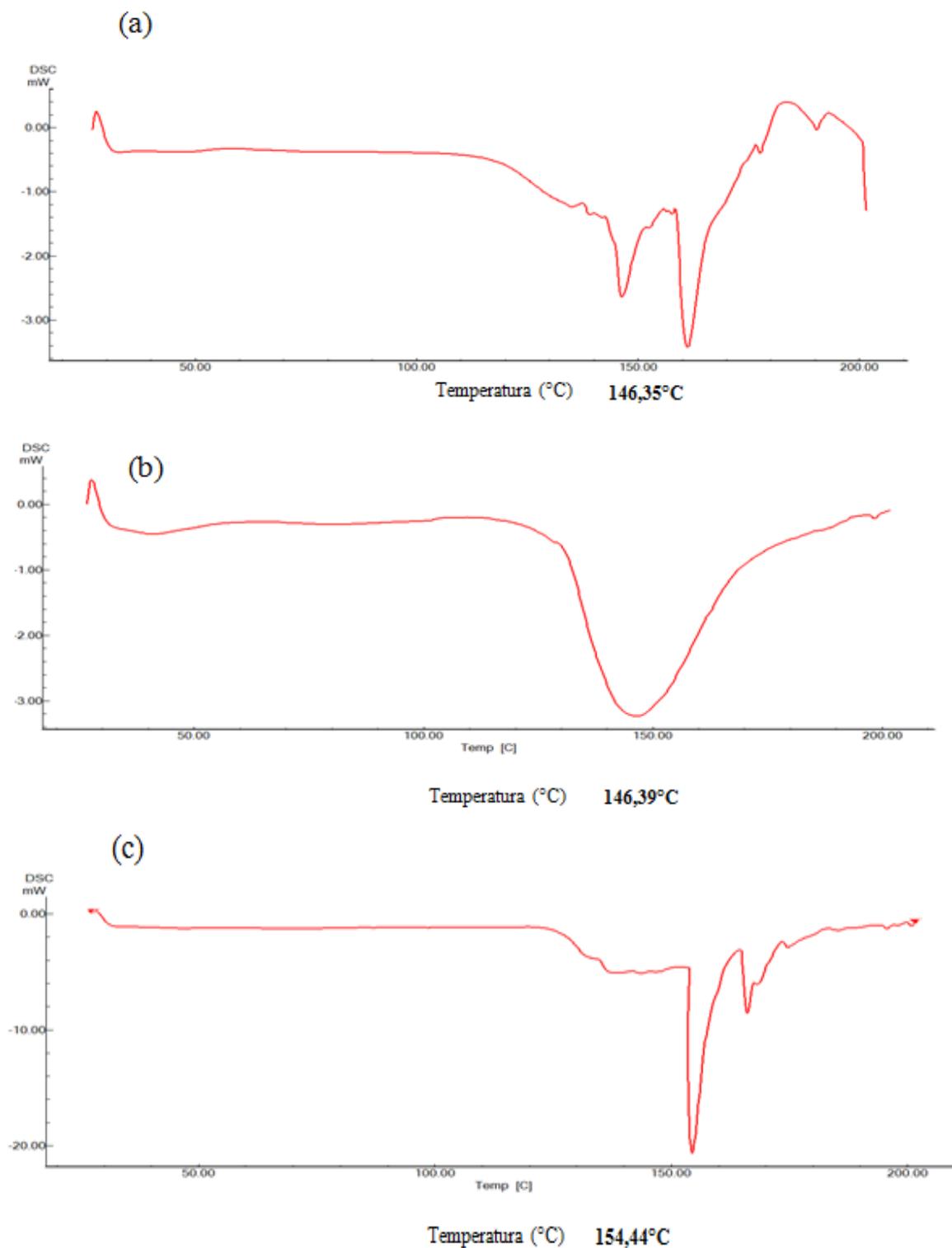
onde as moléculas adquirem maior mobilidade. A partir de uma determinada temperatura as moléculas se organizam na forma de cristais, correspondendo a temperatura de cristalinização ( $T_c$ ), a qual foi de 109,79 °C. O aquecimento acima da  $T_c$  forma um pico endotérmico na curva do fluxo de calor, que corresponde a temperatura de fusão, onde os cristais desestruturam-se e fundem-se devido o aumento da temperatura, como mostrado no Figura 13 esse pico ocorreu a 146,35°C. O calor latente de fusão do filme foi de  $\Delta H$  de -72,93 J/g. e este representa a energia necessária para elevar o estado de agitação molecular que leva o composto do estado sólido para o estado líquido.

Para o tratamento (b) a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) que corresponde ao início da reação, está em torno de 27,69 °C. Por esse arranjo ser mais estável não foi possível identificar no gráfico uma curva de formação cristalina, a temperatura de fusão está em torno de 146,39 °C e o calor latente do filme foi de  $\Delta H$  -86,92J/g. Já na Figura 13 (c) a  $T_g$  foi de 28,15 °C, a temperatura de transição cristalina foi de 146,60 °C, o pico de fusão foi de 154,44°C e o  $\Delta H$  de -139,30 J/g.

Através dos dados obtidos é possível concluir, que os tratamentos contendo óleos essenciais apresentaram valores de temperatura de fusão e do calor latente maiores que no filme controle, isso ocorreu possivelmente devido a uma maior estabilidade térmica da matriz filmogênica dos tratamentos com OEC, visto que é perceptível que com a adição do óleo essencial as curvas de fluxo de calor apresentaram menos variações. Segundo Hoque et al. (2010) altas temperaturas de fusão e de entalpia podem ser explicadas por uma maior interação na rede polimérica afetando a estabilidade térmica do filme pela presença de interações intermoleculares na proteína, tais como ligações de hidrogênio, interações iônicas e interações hidrofóbicas, as quais estabilizam a rede polimérica do filme.

Ferreira (2014) ao avaliar filmes a base de proteínas de pescado incorporados com óleos essenciais, também verificou através da análise de DSC um aumento na temperatura de fusão e no calor latente dos filmes com óleos essenciais em sua formulação, quando comparados com o filme sem óleos essenciais.

**Figura 13.** DSC de filmes de isolado proteico de Pintado.



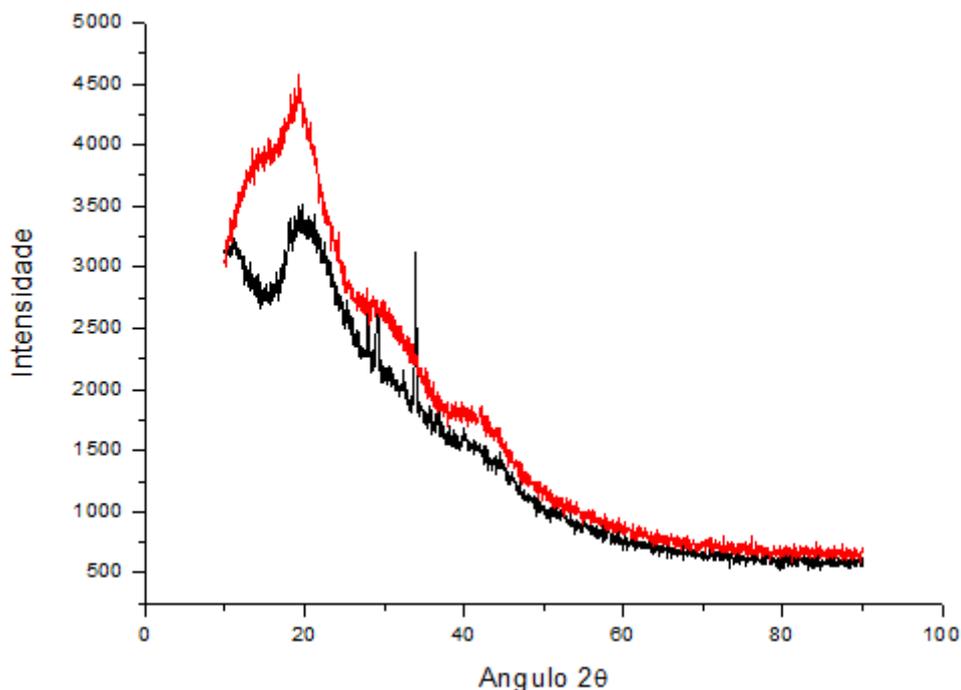
Onde: a (2,5g IPP, 0,37g glicerol); b (2,5g IPP e 0,1g OEC) c (2,5g IPP e 0,5g OEC).

Segundo Wang et al (1999) quando  $\Delta H$  apresenta valores próximos à zero, indica que as proteínas estão completamente desnaturadas, nesse caso podemos dizer que o IPP foi desnaturado devido aos valores de  $\Delta H$  terem dado abaixo de zero.

### 5.2.4 Difração de Raios-X (DRX)

A Figura 14 apresenta a análise de DRX para os filmes com e sem OEC.

**Figura 14.** Difratoograma de filme de isolado proteico.



Onde: — possui OEC e — não possui OEC

O tratamento sem óleo mostra um único pico de reflexão  $2\theta = 19,2812^\circ$ , já o filme com óleo essencial de cravo apresentou picos de reflexões em  $19,7828^\circ$  e  $33,8802^\circ$ . Esses picos indicam uma baixa cristalinidade nos filmes, visto que a difração de raios-X (DRX) surge da interação da radiação eletromagnética com átomos da rede cristalina de um sólido, uma vez que o comprimento de onda dos raios-X é da mesma ordem que a separação dos átomos em um cristal.

Outra possível justificativa para a amorfização dos filmes, é que as proteínas são capazes de formar estruturas tridimensionais amorfas, estabilizadas principalmente por interações não covalentes, e os plastificantes por reduzirem as interações entre as moléculas e aumentarem a mobilidade das cadeias poliméricas, reduzem a cristalinidade dos polímeros (CUQ et al., 1998; MALI et al., 2006).

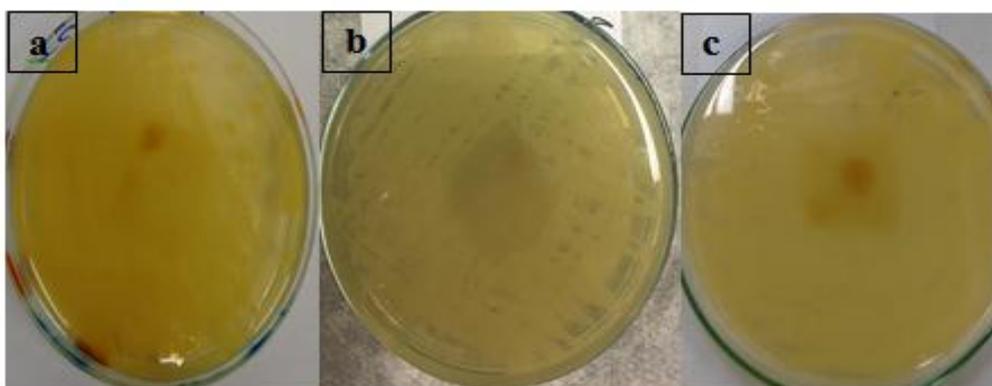
Os pequenos picos obtidos próximos a  $20^\circ$  são característicos da fase cristalina de polímeros em filmes biodegradáveis (PATTABI, AMMA e MANZOOR, 2007).

Menezes (2014) ao analisar a DRX em filmes de isolado proteico de frango sem nanoargilas, também identificou a natureza amorfa dos polímeros. Moura et al (2009) em filmes finos calcogênicos, observou 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.

### 5.2.5 Análise microbiológica de filmes de IPP incorporados com óleo essencial de cravo

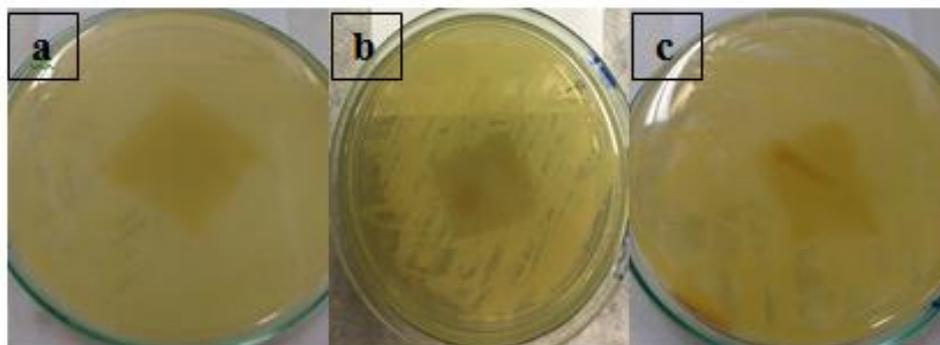
Os resultados da avaliação microbiológica dos filmes realizada pelo método de difusão de disco estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17. O tratamento controle não continha óleo essencial de cravo em sua formulação e como esperado não houve inibição microbiológica para nenhuma das bactérias testadas, porém os filmes com óleo essencial de cravo nas concentrações de 0,1 e 0,5g não foram capazes de formar halo inibitório para nenhum dos micro-organismos testados, possivelmente devido a junção dos fatores: baixo teor de óleo essencial utilizado e sua elevada volatilização.

**Figura 15.** Atividade antimicrobiana de filmes de isolado proteico de Pintado com e sem incorporação de óleo essencial de cravo para *Staphylococcus aureus*.



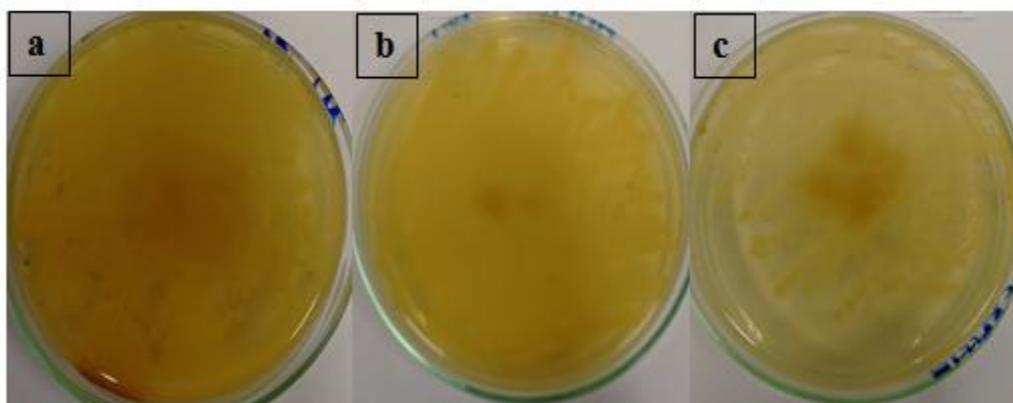
Onde: (a) filme com 2,5g de IPP e 0,37g de glicerol; (b) filme com 2,5g de IPP, 0,37g de glicerol e 0,1g de OEC; (c) filme com 2,5g de IPP, 0,37g de glicerol e 0,5 g de OEC.

**Figura 16.** Atividade antimicrobiana de filmes de isolado proteico de Pintado com e sem incorporação de óleo essencial de cravo para *Escherichia coli*.



Onde: (a) filme com 2,5g de IPP e 0,37g de glicerol; (b) filme com 2,5g de IPP, 0,37g de glicerol e 0,1g de OEC; (c) filme com 2,5g de IPP, 0,37g de glicerol e 0,5 g de OEC.

**Figura 17.** Atividade antimicrobiana de filmes de isolado proteico de Pintado com e sem incorporação de óleo essencial de cravo para *Salmonella Enteritidis*.



Onde: (a) filme com 2,5g de IPP e 0,37g de glicerol; (b) filme com 2,5g de IPP, 0,37g de glicerol e 0,1g de OEC; (c) filme com 2,5g de IPP, 0,37g de glicerol e 0,5 g de OEC.

Ferreira (2014), em sua análise sobre a avaliação microbiológica de filmes de pescado, obteve resultados semelhantes ao presente trabalho, onde os tratamentos formulados com 1,0 ml de OEC não foram capazes de formar halo de inibição para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*. Menezes (2014) também não identificou a formação de halo inibitório em filmes de proteínas de frango incorporados com 0,8 e 1,2% de óleo essencial de orégano para nenhum dos micro-organismos verificados.

Hoffmann (1999), após testar o óleo de cravo concluiu que este óleo, na concentração de 10,0%, inibiu completamente o crescimento de vinte e um microorganismos testados, dentre eles *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* e *Salmonella Enteriditis*. Esses dados reforçam o que ocorreu neste estudo onde não houve a inibição microbiana, provavelmente pela concentração de óleo essencial de cravo utilizado ser muito baixa.

Condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados também são fatores podem interferir na análise microbiológica (RÍOS e RECIO, 2005).

## 6. CONCLUSÃO

O processo de variação de pH foi eficaz na redução do teor de lipídios da CMSP, resultando num isolado proteico com alta concentração de proteínas. A elevada capacidade de retenção de água e solubilidade indicam que o IPP poderia ser utilizado para elaboração de produtos com maior valor agregado e também no desenvolvimento de filmes e coberturas comestíveis.

Foi possível desenvolver filmes utilizando isolado proteico obtido de subprodutos do Pintado. Os filmes mostraram propriedades diferentes dependendo da concentração das variáveis proteína, glicerol e OEC.

A coloração da proteína e do OEC foram influentes nas respostas de opacidade, onde teores mais elevados dessas variáveis resultaram em filmes mais opacos. O maior índice de solubilidade obtido foi em biopolímeros com elevado teor de glicerol e baixo valor de proteína e óleo, sendo essas três variáveis influentes na solubilização da matriz filmogênica. A característica higroscópica do plastificante interferiu na permeabilidade dos biofilmes, visto que em elevadas concentrações de glicerol a PVA foi maior.

Os filmes em geral mostraram maior alongação quando elaborados com alta concentração de glicerol e baixa concentração de IPP, ocorrendo o inverso para resistência à tração. A alongação também foi afetada pela adição de óleo essencial de cravo na solução filmogênica, ocasionando uma possível desorganização da matriz e conseqüentemente gerando filmes com menor elasticidade.

A análise de microestrutura superficial dos filmes revelou a presença de algumas imperfeições estruturais, além de gotas lipídicas, evidenciando que não houve a completa estabilização das moléculas de OEC na matriz dos polímeros. Porém o óleo essencial de cravo atuou como antimicrobiano, visto que não houve desenvolvimento de micro-organismo no tratamento com OEC.

Através dos gráficos de calorimetria diferencial de varredura foi possível concluir que a presença do OEC proporcionou maior estabilidade térmica nos filmes, visto que os tratamentos com óleo apresentaram valores de temperatura de fusão e calor latente maiores que o tratamento controle, e também é notável que no experimento sem óleo ocorreram mais variações na curva de fluxo de calor.

Devido a baixa concentração de óleo essencial de cravo utilizado e a rápida evaporação do mesmo, os filmes não foram capazes de inibir o desenvolvimento dos micro-organismos testados.

Em geral, o filme que apresentou as melhores características em relação as análises realizadas foi o tratamento 6, podendo ser uma alternativa de uso como embalagem. No entanto, mais estudos são necessários para melhorar suas propriedades mecânicas e de barreira, além de testar sua atividade antimicrobiana em concentrações maiores de óleo essencial.

A elaboração de filmes de proteínas extraídas da CMSP agregou valor a um material de descarte, contribuindo para a redução dos impactos ambientais e oferecendo uma alternativa viável e de custo baixo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALVES, A. R. F. *Doenças alimentares de origem bacteriana*. Dissertação de Mestrado Universidade Fernando Pessoa Faculdade Ciências da Saúde, Portugal, 87p. 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Decreto nº 3029 de 16 de abril 1999. *Resolução - RDC Nº 12*. 2001. Art 11, inciso IV. Disponível em: << portal.anvisa.gov.br >> Acesso em 25 de janeiro de 2017.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 16th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

ARAUJO-FARRO, P. C. *Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (Chenopodium quinoa Willdenow) da variedade "Real"*. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 320p., 2008.

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.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). *Caderno Pesquisa*, São Luís, v. 20, n. especial, 2012.

ASTM. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard terminology relating to plastics – D 883, *Annual book of ASTM*, Philadelphia, PA: 2000.

AYALA, M. E. G. Estrutura y composición química del pescado. In: CURSO DE CAPACITACIÓN. Surimi. Callao: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. 2001.

BENAVIDES, S. A.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R. B.; Reyes, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, v. 110, p. 232–239, 2012.

BENITES, C. *Caracterização genética do pintado Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microsatélite, 2008.

BERY, C. C. S.; NUNES, M. L.; SILVA, G. F.; SANTOS, J. A. B.; BERY, C. S. Estudo da viabilidade do óleo de vísceras de peixes marinhos *Seriola Dumerlii* (ARABAIANA), *Thunnus ssp* (ATUM), *Scomberomorus cavala* (CAVALA) e *Carcharrhinus spp* (CAÇÃO) comercializados em Aracaju-SE para a produção de biodiesel. *Revista GEINTEC*, São Cristóvão, SE, v.2, n.3, p. 297-306, 2012.

BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. M.; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, 50-58, 2016.

BOBBIO, F.; BOBBIO, P. A.; *Introdução à química de alimentos*, 2a ed., Editora Varela: São Paulo, 1995.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. *Introdução à química de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 238 p., 2003.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S.; JANTAWAT, P.; SANGUANDEEKUL, R. Effect of plasticizer type and concentration on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *Food Science and Technology International*, 12, 119- 126, 2006.

BOURTOOM T. e CHINNAN M.S. Improvement of Water Barrier Property of Rice Starch-chitosan Composite Film Incorporated with lipids. *Food Science and Technology International*, v.15; n.149, p. 234-239, 2009.

BRENNER, T. JOHANSSON, R.; NICOLI, T.; Characterisation and thermo-reversible gelation of cod muscle protein isolates. *Food Chemistry*, v.115, p.26-31, 2009.

BRITTO, A. C. P.; ROCHA, C. B.; TAVARES, R. A.; FERNANDES, J. M.; PIEDRAS, S. T. N.; PIUEY, J. L. O. F. B. Rendimento corporal e composição química do filé da viola (*Loricariichthys anus*). *Ciência Animal Brasileira*, v.15, n.1, p. 38-44, 2014.

BROWN, P.D., MORRA, M.J., MCCAFFREY, J.P., AULD, D.L. & WILLIAMS III, L. Allelochemicals produced during glucosinolate degradation in soil. *Journal of Chemical Ecology* 17:2021-2034, 1991.

BROWN, P.D. & MORRA, M.J. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:3070-3074, 1995.

CAI, L.N. & WU, C.D.. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products* 59:987-990, 1996.

CBIP – Curso Básico Intensivo de Plásticos. Apostila da indústria de produção e transformação de plásticos no Brasil, aditivos utilizados em polímeros e processamento de polímeros. *Jornal de Plásticos online*. Disponível em <<<http://www.jorplast.com.br/cbipep/versao.htm>>> , acesso dia 19 de outubro de 2006.

CALLEGARIN, F.; GALLO, J.A.Z.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Lipids and Biopackaging. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v. 74, n. 10, p. 1183-1192, 1997.

CAMILO, A. G.; FONSECA, G. G.; CAVENAGHI, A. D.; AZAMBUJA, P. H. Obtenção de concentrado proteico a partir de carne mecanicamente separada de pescado pintado. In: 8º Encontro de Iniciação Científica (ENIC), 2010. *Anais...* Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul – UEMS, n.2, 2010.

CÂNDIDO, L. M. B; NOGUEIRA, A. K.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de concentrados protéicos de pescado preparados por vários métodos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.1, p.77-89, 1998.

CARMO, L.S. Revista Minas Faz Ciência, n.11, jun/ago., 2002. Disponível em: <<<http://www.fapemig.br/pt-br/revista-minas-faz-ciencia>>>. Acesso em: 20 março. 20017.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. “Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties”, *Food Chemistry*, v. 120, n. 3, p. 652-657, 2010.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Em *Aminoácidos, peptídios y proteínas; Fenemma, O.*, ed.; 2ª ed., Editora Acribia: Zaragoza, cap. 5.1993.

CHEN, H. Functional Properties and Applications of Edible Flms Made of Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

CHILLO, S.; FLORES, S.; MASTROMETTO, M.; CONTE, A.; GERSCHENSON, L.; DEL NOBILE, M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, vol.88, p. 159-168, 2008.

CHIRITA, M. Mechanical properties of collagen biomimetic films formed in the presence of calcium, silica and chitosan. *Journal of Bionic Engineering*, Changchun, v. 5, n. 2, p. 149-158, 2008.

CHONG, B.S., FORD, T.R.P. & KARIYAWASAM, S.P.. Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. *International Endodontic Journal* 30:240-249, 1997.

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

CORRÊIA, V.; SILVA, L. P.; PEDRON, F. A.; LAZZARI, R.; FERREIRA, C. C.; RADÜNZ, N. Fontes energéticas vegetais para juvenis de jundiá e carpa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, p. 693-671, 2012.

CORTEZ-VEGA, W. R. *Desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado proteico de corvina (Micropogonias furnieri)*. Tese (Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 139 p., 2011.

CORTEZ-VEGA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: Avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 16, n. 2, p. 90-98, 2013.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science*, v.60, n.6, p.1369-1374, 1995.

CUQ, B. *Mise en forme et caractérisation de biomatériaux à base de protéines myofibrillaires*. Montpellier: Université de Montpellier II, 213p. Thèse de Doctorat, 1996.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, v. 75, n. 1, p. 1-9, 1998.

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

DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU, P.; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27(2): 408-416, abr.-jun. 2007.

DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, v. 56, n. 11, p. 69-78, 2002.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: Mechanical and Thermal Properties as a Function of Plasticizer Content. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 45, p. 685-689, 1997.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; ANON, M. C.; SOBRA, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, v. 90, p. 341-349, 2009.

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.

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

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das aves*. Campinas: Facta, cap.4, p. 457-474, 2009

FERREIRA, F. A. Filmes Nanocompósitos Antimicrobianos Obtidos a Partir de Proteínas de Pescado e Nanoargila Incorporados com Óleos Essenciais. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos), Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2014.

FREITAS, I.R. *Recuperação das proteínas provenientes de pescado utilizando o processo de variação de pH*. 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande), Rio Grande, 2011.

FONKWE, L.G; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*, v.31, n.6 p.605-616, 1996.

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

FORTUNY, R. C. S.; BELLOSO, M.O. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 14, n. 9, p. 5774-5779, 2003.

FURTADO, A. S. *Produção, avaliação e aplicação de filmes nanocompósitos obtidos a partir de extrato proteico da microalga Spirulina platensis*. Tese (Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 146 p., 2013.

GACULA, M. C.; SINGH, J. *Statistical methods in food and consumer research*. London: Academic Press, INC., 1984.

GALIETTA, G.; Di GIOLA, L.; GUIBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 12, p. 3123-3130, 1998.

GALDEANO, M. C.; GROSSMANN, M. V. E; MALI, S.; BELLO-PEREZ, L. A.; GARCIA, M. A.; ZAMUDIO-FLORES, P. B. Effects of production process and plasticizers on stability of films and sheets of oat starch. *Materials Science and Engineering: C*, v.29, n. 2, p. 492-498, 2009.

Gonçalves A. A. (Org.) *Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação*. São

Paulo: Editora Atheneu, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, n.1, p.3-15, 1996.

GONTARD, N. *Films et enrobages comestibles: etude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten*. Montpellier: Université de Montpellier II. Thèse de Doctorat, 1991.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J-L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v.29, p.39-50, 1994.

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

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. *In Food packaging and preservation: theory and practice* (Ed M. Mathlouthi), p. 371-394. London, UK: Elsevier Applied Science Publishing Co. 1986.

GUIMARÃES, S. S.; LUCKMANN, D.; GOUVÊA, A.; CITADIN, I.; MAZARO, S. M. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.38, n.7, p. 1824-1829, 2008.

GUND, J. et. al. Avaliação Sensorial do comportamento da proteína do soro de leite bovino, como emulsificante em embutido de pescado. In: 3º Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos- Simpocal. Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

HALAL, S. L. M. *Desenvolvimento e caracterização de filmes a base de isolado proteico de resíduos de corvina (Micropogonias furnieri) e óleo de palma*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 126 p., 2012.

HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M.P.; SARMENTO, S.B.S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 1, p. 231-240, jan./mar., 2008.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana “*in vitro*” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. *Boletim do CEPPA*, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 11-20, 1999.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, v.22, n.4, p.273-92, 2005.

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

HOSSAIN, M. A.; AL-HASHMI, WELI, R. A.; A. M.; AL-RIYAMI, AL-SABAHIB, Q.; J. N. Constituents of the essential oil from different brands of *Syzygium caryophyllatum* L by gas chromatography-mass spectrometry. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. 1446-1449, 2012.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W., TANAKA, M. Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, v.222, p.229-235, 2006.

KAIN, R.J; CHEN, Z.; SONDA, T.S. ABU-KPAWOH. Study on the effects of control variables on the extraction of peanut protein isolates from peanut meal (*Arachies hypogaea* L.). *American Journal of food technology*. 4(1), 47-55, 2009.

KNOTHE, G; GERPEN, J. V; KRAHL, J; RAMOS, L. P. “*Manual de Biodiesel*”. Tradução Luiz Pereira Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KAPLAN, A.E., PICCA, M., GONZALEZ, M.I., MACCHI, R.L. & MOLGATINI, S.L. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. *Endodontics and Dental Traumatology* 15:42-45, 1999.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, vol. 40, n. 12, p. 47-59, 1996.

KRISTINSSON, H. G; INGADOTTIR, B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilápia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. *Journal of Food Science*, v.71, n° 3, 2005.

KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, v.51, n.2, p.60-74, 1997.

KUBTIZA, F.; CAMPOS, J.L.C.; BRUM, J.A. VALENTI, W.C.; ZIMMERMANN, S.; POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; DE MORAES, F.R.; VOLPATO, G.; CÂMARA, M.R. (Ed.). A produção intensiva de surubins no Projeto Pacu Ltda. e Agropeixe Ltda. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 1998. *Anais...* Recife – PE. vol.1, p. 393-407, 1998.

LAGARÓN, J. M.; OCIO, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A. *Antimicrobial polymers*, John Wiley & Sons, Inc., 608 p., 2012.

LARSEN, A. C. *Co-digestão anaeróbia de glicerina bruta e efluente de fecularia..* 55 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Cascavel, 2009.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIR, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetic Molecular Research*, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 75, 453– 460, 2006.

MARTINS, V. G; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Química Nova*. v. 32, n.1 p. 61-66, 2009.

MARTINS, W. S. *Inquérito exploratório referente à geração, armazenamento, transporte e descarte de resíduos em indústrias de pesca do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, 99 p., 2011.

MCHUGH, T. H., AUJARD, J. F & KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. *Journal of Food Science*, 59: 416-20, 1994.

MENEZES, B. S. *Obtenção e Avaliação de Filmes Nanocompósitos Antimicrobianos com Isolado Protéico de Frango e Nanoargilas*. Tese de Doutorado, Escola de Química e Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rio Grande, RS, 85p. 20014.

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.

MOYLE, P. B. e CECH Jr, J.J. *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Prentice Hall, Inc. Englewoof Cliffs, New Jersey. 559p, 1988.

MOTA, C.; SILVA, C. “Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel”. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ, Brasil. *Química Nova*. Vol. 32. Nº 3. P. 639-648, 2009.

MÜLLER, C. M. O. *Estudo dos processos de transferência de massa e propriedades mecânicas de biofilmes de amido de mandioca reforçadas com fibras de celulose*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

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.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24, 101-108, 2004.

NEIVA, C. R. P. Aplicação da tecnologia de carne mecanicamente separada – CMS na indústria de pescado. In: Simpósio de Controle do Pescado, 2006. *Anais...* São Vicente: Instituto de Pesca, p. 1-7, 2006.

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.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri: Manole, 612 p., 2006.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. Química do pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E. L. *Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado*. São Paulo: Varela, v. 1, cap. 4, p. 27- 71, 1999.

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.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT - Food Science and Technology*. 2007.

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

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, S.P.L.F. *Avaliação da Aplicação de Óleo Essencial de Orégano em Filme de Proteína de Soro do Leite*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite. Universidade Norte do Paraná, 2013.

ORDOÑEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*, Porto Alegre: Artmed, 1v, 2005.

ORTIZ, E.L. *The Encyclopedia of Herbs, Spices, and Flavourings*. *Dorling Kindersley Publishers*, London, 1992.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, v. 84, n.1, p. 116-133, 2008.

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

PACHECO, M. T. B; SGARBIERI, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas aplicações nas propriedades funcionais. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 36, 83-94, 2002.

PAIVA, L.B.; MORALES, A.R.; GUIMARÃES, T.R. Propriedades Mecânicas de Nanocompósitos de Polipropileno e Montmorilonita Organofílica. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.16, p. 136-140, 2006.

PARRIS, N.; COFFIN, D.R.; JOUBRAN, R.F.; PESSEN, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.1432-1435, 1995.

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.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R. COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICOLLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciências e Agrotecnologia*, vol. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PERESSINI, D.; BRAVIN, B.; LAPASIN, R.; RIZZOTI, C.; SENSIDONI, A. Starchmethylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59, 25-32, 2003.

PEROVAL, C.; DEBEAUFORT, F.; DESPRÉ, D.; VOILLEY, A. Edible arabinoxylan based films: Effects of lipids types on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.3977-3983, 2002.

PRATES, M. F. O. Elaboração e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de fruta-de-lobo e sorbitol e aplicação da cobertura em frutos de morango. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2010.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the Salmonella serovars. In: 7<sup>a</sup> REVISION WOLD HEALT ORGANIZATION COLLABORATING CENTRE FOR REFERENCE AND RESEARCH ON SALMONELLA, 1997, França. *Anais Pasteur Institute*, França, 1997.

PROCHMANN, Â. M.; TREDEZINI, C.A. O. A Piscicultura em Mato Grosso Do Sul, Como Instrumento de Geração de Emprego e Renda na Pequena Propriedade. Fortaleza: SOBER, 2003.

PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; ARTHAN, A. Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 605-614, 2007.

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

RAINA, V.K., SRIVASTAVA, S.K., AGGARWAL, K.K., SYAMASUNDAR, K.V. & KUMAR, S.. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour Fragrance Journal* 16:334-336, 2001.

REID, S.L. La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. tigrinum* en la cuenca del río Apure. Venezuela. *Revista Unellez de Ciencia e Tecnología*. Serie: Producción Agrícola. Barinas, 1: 13-41, 1983.

REGENSTEIN, J. M.; JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. The effect of pH, polyphosphates and different salt on water retention properties of ground trout muscle, *Journal of Food Biochemistry*, v. 8, p. 123-131, 1984.

RHIM, J. A.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. M. Sodium dodecyl treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. *Industria Crops and products*, Lincoln, v.15, p.199-205, 2002.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 411- 433, 2007.

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

ROCHA, M. *Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes proteicos a base de anchoita (Engraulis anchoita) incorporados com ácidos orgânicos*. Dissertação de

Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande-FURG, 144 p., 2012.

SÁNCHEZ, A. A.; ESPINOSA, M.E.; VÁSQUEZ, E.N.O.; CAMBEROS, E.P.; VÁSQUEZ, R.S.; CARVANTES, E.L. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 50, p. 585-590, 2010.

SANTOS, P.V. Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, *Faculdade de Engenharia de Alimentos*, 2004.

SANTOS, André Luis dos et al . *Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar*. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, Dec. 2007.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; DAMIÃO, A. O.; BARROS, T. F.; ROSS-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapt & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 124-129, 2010.

SATO, Y. e OSORIO, F.M.F. A pesca profissional na região de Três Marias, em 1986. In: Encontro Anual de Aquicultura DE Minas Gerais, 5. Belo Horizonte. *Resumos*. Encontro da Associação Mineira de Aquicultura-AMA;1982-1987.CODEVASF, Brasília. p. 91-92, 1988.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P.; BABBITT, W. P.; NESGULESCU, I. I.; REPPOND, K. Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes stomias*) and Herring (*Clupeaharengus*) Byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 16, p. 5040- 5046, 2004.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela. p. 139-157, 1996.

SHAPIRO, S., MEIER, A. & GUGGENHEIM, B.. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology Immunology* 9:202-208, 1994.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, vol. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SILVESTRI, J. D.F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 57, n.5, p. 589-594, set/out, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 1102 p. 2004.

SMERMAN, W. *Efeito da alimentação na fase larval e pós-larval do Pseudoplatystoma sp (Pimelodidae), na Estação de Piscicultura de Alta Floresta - Mato Grosso*. I Encontro PIBIC, vol. Único, Cáceres, Dez./2002.

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.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

SOBRAL, P. J. A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao Vapor de Água de Biofilmes à Base de Proteínas Miofibrilares de Carne. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, n. 3, p. 11-16, 2000.

SOTHORNVIT, R. e KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149- 155. 2001.

SOUZA, V. C.; MONTE, M. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 46, n. 9, p. 1856–1862, 2011.

SOUSA, G. M. *Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás - UFG, 89 p., 2012.

TACONI, KATHERINE A; JOHNSON, DUANE T. “ *The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production*”. Intercontinental Biodiesel Group, St. Louis. Department of Chemical and Materials Engineering. University of Alabama. Huntsville. Wiley nterScience 2007.

TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Edible wheat gluten films: development, mechanical and barrier properties and application to strawberries (*Fragaria ananassa*), *Boletim CEPPA*, v. 20, p. 291-308, 2002.

TADPITCHAYANGKOON, P.; PARK, J. W.; YONGSAWATDIGUL, J. Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs, *Food Chemistry*, v. 121, p.1046-1052, 2010.

TERRA, N. N. R. A Indústria de produtos cárneos no Brasil. In: *Apontamentos da Tecnologia de Carne*. Ed. Unisinos, p. 1-5, 2000.

TEPE B, Donney E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Unlu GV, Polissiou M & Sokmen AA Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth) *S. multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, 84:519-525, 2004.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, v.14, n.3, p. 71–78, 2003.

TURHAN, K. N.; AHBAZ, F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methycellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, v. 61, 459-466, 2004.

VENUGOPAL, V. Seafood proteins: Functional properties and protein supplements. Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean. Boca Raton: *CRC Press*, p. 51-102, 2009.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. *Revista Ciências Agrônômicas*, v. 42, Nº 1, p. 92-99, 2011.

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.

YARNPAKDEE, S.; BENJAKUL, S.; PENJAMRAS, P.; KRISTINSSON, G. H. Chemical compositions and muddy flavour/odour of protein hydrolysate from Nile tilapia and broadhead catfish mince and protein isolate. *Food Chemistry*, v. 142, p. 210–216. 2014.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L.M.; TELLES, A. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. *Brazilian Journal of Food Technology*, IV SSA, p. 53-57, maio 2012.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 70, n. 1, p. 45–51. 2005.