

OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES BIOATIVOS NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO PROTEICO DE FRANGO E NANOARGILAS

TAIS NUNES ROSA¹, CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ²

RESUMO

A demanda por produtos que não agridam o ambiente com menos aditivos sintéticos, e que contribuam para redução dos resíduos industriais, associada à qualidade dos produtos que possibilitem o aumento de vida útil leva a produção de filmes com propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianos com o intuito de serem aplicados como protetores de produtos alimentícios. O presente trabalho teve por objetivo avaliar filmes bioativos nanocompósitos obtidos a partir de isolado proteico de CMS de frango, acrescidos de nanoargilas com sais de amônio quaternário, determinando sua bioatividade antioxidante e antimicrobiana, e por fim o estudo de vida útil de carne suína. Como resultados foram obtidos valores de 92,2% de proteína de isolado proteico de CMS de frango, os filmes elaborados apresentaram um aumento na resistência à tração conforme aumento adição do nanoargila, enquanto na elongação não houve diferença significativa, apresentaram menor solubilidade e permeabilidade nas maiores concentrações de nanoargila. Na atividade antimicrobiana, os filmes bioativos nanocompósitos apresentaram um halo de efeito bacteriostático, nas concentrações de 0,75% de nanoargila modificada para *Staphylococcus aureus*, e também apresentaram forte atividade antioxidante nas análises de DPPH e para o poder redutor, onde foi verificada que a nanoargila pode vir a influenciar positivamente, sendo que, a mesma acaba por reduzir o potencial antioxidante. Nas propriedades térmicas e ópticas em geral apresentaram-se firmes, coesos e resistente, e para a vida útil foi verificada uma diferença significativa entre as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotóxicos no 9º dia de armazenamento que variaram 0,84 a 0,97 log UFC/g, com a adição da nanoargila foi verificada uma menor perda de massa na carne suína, entretanto a embalagem de policloreto de vinila tipicamente comercial apresentou o melhor resultado significativo neste item. Em geral, foi possível concluir que os filmes bioativos nanocompósitos são eficientes como material de embalagem para alimentos.

PALAVRAS-CHAVES: ISOLADO PROTEICO. MONTMORILONITA. BIOATIVIDADE.

OBTAINMENT AND APPLICATION OF BIOACTIVES NANOCOMPOSITES FILMS OF CHICKEN PROTEIN ISOLATES AND NANOCCLAYS

ABSTRACT

The demand for products that do not damage the environment with less synthetic additives and contribute to the reduction of industrial waste, combined with the quality of products that increase the shelf life leads to the production of films with antioxidant and/or antimicrobial properties for the purpose of being applied as protectors of food products. The aim of the present work was to evaluate bioactive nanocomposite films obtained from chicken CMS protein isolate added of nanoclay with quaternary ammonium

¹Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail:

²Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: dqmprent@furg.br

salts, determining its antioxidant and antimicrobial bioactivity and, finally, in pork meat shelf life study. As results were obtained values of 92.2% of protein isolate of chicken CMS, the elaborated films presented an increase in the tensile strength according to increase the addition of nanoclay, whereas in the elongation there was no significant difference, presented lower solubility and permeability at higher nanoclay concentrations. Regarding the antimicrobial activity, the nanocomposite bioactive films presented a halo of bacteriostatic effect, in the concentrations of 0.75% of modified nanoclay for *Staphylococcus aureus*, and also presented strong antioxidant activity in the analyzes of DPPH and for the reducing power, where it was verified that the nanoclay can influence, being that, it ends up reducing the antioxidant potential. In the thermal and optical properties, in general, they were firm, cohesive and resistant, for the useful life a significant difference was verified between the counts of mesophilic and psicrotrophic microorganisms in the 9th day of storage that varied from 0.84 to 0.97 log UFC / g, with the addition of nanoclay, a lower mass loss in pork was observed, however, the typical commercial polyvinyl chloride package presented the best significant result in this item. In general, it was possible to conclude that nanocomposite bioactive films are efficient as food packaging material.

KEYWORDS: PROTEIN ISOLATE. MONTMORILLONITE. BIOACTIVITY

1. INTRODUÇÃO

A carne mecanicamente separada (CMS) de frango é um produto originado da trituração de partes das carcaças de animais de abate que não são facilmente desossados. Por sua facilidade de obtenção e transformação em produtos industrializados, a utilização de CMS de frango tem se expandido, principalmente pela decorrência da modernização tecnológica [13]. Poucos alimentos contêm proteínas de qualidade com alta incidência de aminoácidos essenciais como as de origem animal, estando amplamente distribuídas na natureza. Proteínas concentradas e isoladas são produzidas em larga escala para servir como ingredientes funcionais em uma crescente gama de aplicações em alimentos. Ao substituir as proteínas convencionais, os concentrados e isolados proteicos, mantêm ou melhoram a qualidade e aceitabilidade dos produtos em que foram incorporados [16].

A obtenção de filmes formulados com matérias-primas oriundas de recursos renováveis têm encorajado a exploração de novos materiais de embalagens, visando o interesse de manter, ou melhorar, a qualidade dos produtos embalados e, ao mesmo tempo, reduzir o desperdício de embalagens [31]. As tecnologias envolvendo embalagens ativas visam o planejamento de embalagens que apresentem interações desejáveis com o produto, aumentando sua vida útil. Tradicionalmente, as embalagens

para alimentos têm sido planejadas para proteger o produto, onde um de seus principais objetivos é servir como barreira inerte entre o alimento e o ambiente [22].

Os filmes bioativos são uma forma de embalagem ativa que pode aumentar a vida útil dos produtos e fornecer segurança aos consumidores. Este tipo de embalagem visa reduzir, inibir ou retardar a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos [25]. A nanotecnologia tem sido explorada como meio de incorporação em embalagens ativas, favorecendo diretamente a estabilidade dos alimentos acondicionados. Outras aplicações têm efeitos indiretos, uma vez que melhoram o desempenho dos materiais (especialmente as propriedades mecânicas e de barreira), aumentando o grau de proteção conferido pelo sistema de embalagem. Filmes em geral incorporados com nanoargilas montmorilonita têm demonstrado bons resultados ao testar as propriedades mecânicas, de barreira e antimicrobiana [4].

Na busca por elaboração de filmes bioativos que possam ser utilizados de maneira comercial, se utiliza como matéria-prima o subproduto CMS, sendo esta de baixo custo, fácil obtenção e, além disso, ao agregar valor à mesma. E aliando isto a utilização de nanoargilas na elaboração destes filmes, por possuir um alto potencial antimicrobiano e também uma capacidade relevante de melhorar as características físicas de filmes.

O presente trabalho teve como objetivo obter filmes proteicos bioativos nanocompositos provenientes de carne mecanicamente separada de frango, acrescidos de nanoargilas organicamente modificadas, para avaliar sua aplicação em alimentos perecíveis visando aumentar sua vida útil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A carne mecanicamente separada (CMS) de frango foi fornecida pela Companhia Minuano Alimentos Ltda., localizada na cidade de Arroio do Meio/RS. A CMS foi transportada à temperatura de -10°C até o Laboratório de Tecnologia em Alimentos (LTA) da FURG, em blocos congelados e armazenada em freezer a -20 °C, até a obtenção do isolado proteico.

Os reagentes utilizados no processamento e nas análises analíticas foram todos de qualidade para análise (PA). A nanoargila utilizada foi a montmorilonita modificada (Cloisite 30B) proveniente da *Southern Clay Products*. A carne suína foi

adquirida em frigorífico localizado na Cidade de Pelotas/RS, transportada até o LTA, em caixas térmicas com gelo a uma temperatura de 4°C.

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Tecnologia dos Alimentos (LTA) e na Planta de Processamento de Pescado (PPP), e no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEMESUL), localizados na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.2 Obtenção do isolado proteico de CMS de frango

O isolado proteico de CMS de frango foi obtido utilizando o processo de variação de pH ou *pH shifting process*, segundo metodologia adaptada de NOLSOE e MORAES et al. [21] e UNDELAND [24]. A matéria-prima foi homogeneizada na proporção 1:9 com água destilada a temperatura de 4°C e triturada em blender durante 1 min. Após, a solubilização alcalina das proteínas foi realizada utilizando o NaOH 1M até atingir o pH 11, controlado por pHmetro em reator encamisado de aço inoxidável acoplado a um banho ultratermostático (QUIMIS, Q212S, Brasil) a 4°C e agitação constante com agitador eixo-hélice (IKA RW20DZM.n, Alemanha), durante 20 min. Após foi realizada a centrifugação a 9000 x g durante 20 min a 4°C em centrífuga de piso refrigerada (HANIL, CR22GIII). Neste momento ocorreu a separação em 3 fases, onde obteve-se as proteínas insolúveis, os lipídios neutros e as proteínas solúveis. As proteínas solúveis foram submetidas à precipitação isoelétrica utilizando HCl 1M até atingir pH 5,0, então permaneceu durante 20 min a 4°C, e após este período retornaram para a centrifugação a 9000 x g durante 20 min. Nesta fase, ocorreu a separação da água das proteínas precipitadas recuperadas úmidas. Logo, elas foram submetidas a desidratação, onde as amostras inicialmente foram mantidas em ultra freezer (INDREL, IULT90-D, Brasil) à temperatura de -80°C durante 48 h, e logo liofilizadas por 48 h, utilizando liofilizador (LIOTOP, L108, Brasil). Finalmente as proteínas liofilizadas foram trituradas e armazenadas em frasco de vidro à temperatura ambiente.

2.3 Obtenção dos filmes e blendas ativos nanocompósitos

Testes preliminares foram realizados para definir as melhores concentrações de trabalho, variando diferentes quantidades de isolado proteico, glicerol e montmorilonita conforme vários autores [10,20,28]. A formulação escolhida para elaboração dos filmes foram: Filmes Proteicos (PP) 3,0% de isolado proteico de frango (IPF), 20% de glicerol e para os Filmes Proteicos incorporados com nanoargila (P30b)

foram as mesmas quantidades de IPF e glicerol acrescidos de 0,5 ou 0,75% de nanoargila.

O método utilizado para o desenvolvimento dos filmes foi o de *casting*, onde o isolado proteico de CMS de frango foi disperso em água destilada à temperatura de 25°C. O pH foi ajustado até 11 com adição de NaOH 1M, mantendo agitação constante por 20 min em agitador mecânico de eixo-hélice (Fisatom, 713D) para que ocorra a solubilização das proteínas. Logo, foram adicionados a nanoargila e o glicerol, previamente solubilizados em água destilada, e homogeneizados em Ultraturrax (IKA T25D, Werke, Alemanha) na velocidade de 10000 rpm durante 5 min. Em seguida a solução foi transferida para um banho termostático (BROOKFIELD, TC-102, EUA) acoplado a um reator encamisado de vidro, a solução foi levada a 80°C sob agitação durante 30 min para formação da solução filmogênica. No caso das blendas é nesta etapa que o ágar é incorporado, este foi previamente solubilizado em água destilada, durante 20 min a 80°C, sob agitação contínua em agitador magnético. A solução filmogênica foi retirada do reator passando por um filtro para retirada de resíduos sólidos, após foi espalhada em placa de Petri e submetida à secagem em estufa com circulação de ar a 40 °C por 12 h (FANEM, 520, São Paulo, Brasil). Os filmes foram armazenados por 48 h em dessecadores mantidos a 25°C com umidade relativa controlada de 55% usando solução saturada de cloreto de cálcio. Logo, os filmes foram retirados das placas de petri e conduzidos para caracterização e aplicação em alimentos.

2.4 Metodologia analítica

2.4.1 Composição proximal química

A composição proximal química foi determinada na matéria-prima, no isolado proteico de frango, caracterizada de acordo com os métodos recomendados pela AOAC [1], determinando o conteúdo de umidade pelo método gravimétrico em estufa a 105°C, n° 935.29; o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, n° 920.87, sendo o teor de proteína bruta obtido através da multiplicação pelo fator 6,25; o conteúdo de lipídios obtido pelo método de Soxhlet, n° 920.85 e as cinzas pelo método gravimétrico em mufla à 550°C, n° 923.03.

2.4.2 Caracterização dos Filmes

2.4.2.1 Espessura

Após o período de acondicionamento, a espessura das embalagens foi medida utilizando um paquímetro digital (INSIZE, IP54, São Paulo, Brasil). A espessura foi fixada como sendo a média aritmética de 10 medidas aleatórias sobre a área do filme.

2.4.2.2 Cor e Opacidade

As medidas de cor e opacidade foram determinadas em colorímetro (Minolta CR 400), usando sistema [8], $L^*a^*b^*$ (modelo CR-400). O L^* indica a luminosidade e os parâmetros de cor a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade, onde L^* varia de zero (preto) a 100 (branco), a^* , varia do verde (-) ao vermelho (+) e b^* , varia do azul (-) ao amarelo (+). A opacidade foi calculada relacionando os resultados frente a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto (P preto) e ao padrão branco (P branco), segundo a Equação 1.

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{P_{\text{preto}}}{P_{\text{branco}}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.2.3 Propriedades Mecânicas

A resistência à tração – RT (Mpa) e a alongação até a ruptura – ER (%) dos filmes foram determinadas segundo metodologia recomendada pela *American Society for Testing and Materials* – ASTM D882-91 [2] em texturômetro TA.XT plus (*Stable Micro Systems, Inglaterra*) com adaptações. As amostras foram cortadas em forma de retângulo (100 x 20 mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50 mm. A RT e ER foram mensuradas em 9 retângulos de filmes, onde se obteve os resultados por triplicatas.

2.4.2.4 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada em triplicata por método gravimétrico a 25°C, de acordo com a metodologia descrita pela norma ASTM E96-95 [3].

$$\text{PVA} = \frac{w}{t \cdot A} \cdot \frac{X}{\Delta P} \quad (2)$$

sendo, PVA= permeabilidade ao vapor de água (g.mm).(m².d.kPa)⁻¹; w = massa de umidade absorvida (g); t = tempo de duração do teste (dias); X = espessura média do filme (mm); A = área da superfície exposta do filme (m²); ΔP = diferença de pressão parcial de vapor através do filme (kPa).

2.4.2.5 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi realizada segundo método proposto por GONTARD, GUILBERT e CUQ [14], com algumas modificações. Para o cálculo dos valores de solubilidade S (%) foi utilizada a Equação 3.

$$S = \frac{m_i - m_f}{m_i} \cdot 100 \quad (3)$$

2.4.2.5 Morfologia

A morfologia dos filmes foi analisada utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), As amostras foram analisadas para determinar as características de superfície usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JSM 6060, JEOL, Japão) operando a 10 kV. As amostras foram colocadas sobre *stubs* de alumínio e revestidas de camada de ouro antes de obter as imagens.

2.4.3 Avaliação da Bioatividade

2.4.3.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes incorporados com diferentes concentrações de nanoargila frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi realizada em triplicata através do método de difusão em discos segundo CLSI [9]. Como controle foram utilizados filmes e blendas sem a incorporação da nanoargila. As placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 24 h. Os diâmetros do halo de inibição foram medidos perpendicularmente em mm e o resultado final foi expresso como a média de três medições.

2.4.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Para realização das análises de antioxidantes foi utilizado o método baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. As amostras de filmes foram preparadas utilizando 100 mg dos filmes e adicionados 2 mL de metanol. Essa mistura (extrato) foi mantida sob agitação horizontal (100 rpm) durante 3 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O consumo do radical livre DPPH dos filmes foi monitorado conforme metodologia de HERRERO et al. [16], através da determinação do decréscimo da unidade de absorbância (UA) nas soluções de reação. A capacidade de sequestrar o radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical, e calculado conforme a Equação 4.

$$\% \text{ inibição} = \frac{UA_{\text{controle}} - UA_{\text{amostra}}}{UA_{\text{controle}}} \cdot 100 \quad (4)$$

O poder redutor dos filmes foi determinado em triplicata de acordo com o método modificado de OYAIZU [26] como descrito por WENG et al. [32]. Os extratos dos filmes foram realizados da mesma maneira que a metodologia anterior porém o solvente utilizado foi água. A absorbância foi registrada após 10 min da reação em espectrofotômetro num comprimento de onda 700 nm. O branco foi realizado somente com água sem o extrato de filmes.

2.5 Aplicação dos filmes como embalagem nanocompósitas ativas

A carne suína utilizada foi o lombo suíno, adquirido e transportados em caixas térmicas com gelo picado, a carne foi cortada em porções de aproximadamente 30 g (5 x 4 x 4 cm), e estes foram revestidos com os filmes selecionados, e com embalagem comercial de PVC (cloreto de polivinila), para que pudessem ser comparados os resultados dos diferentes tratamentos e armazenados a 7°C. Foram realizadas as análises de perda de massa, e contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos em intervalos de 0, 3, 5, 7 e 9 dias.

2.5.1 Perda de massa

A determinação de perda de massa foi obtida relacionando-se a diferença entre o peso inicial do produto e o peso obtido ao final de cada tempo de armazenamento. Os resultados serão expressos em porcentagem de perda de massa.

2.5.2 Contagem de Mesófilos e Psicotróficos

Para a determinação da contagem total de microrganismos viáveis, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 37°C durante 48 h para microrganismos mesófilos e a 7°C durante 10 dias para psicrotróficos. O limite de contagem adotado foi de 25 a 250 UFC por placa, sendo que as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 Análise estatística

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey para determinar diferença estatisticamente significativas com 95% de confiança entre médias ($p \leq 0,05$), usando o programa *Statistica 5.0* (Statsoft, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química proximal

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos da composição proximal química da CMS de frango e do isolado proteico de frango utilizados para execução desse trabalho.

TABELA 1- Composição química proximal da carne mecanicamente separada de frango e do isolado proteico de frango.

Componente (%)	CMSF (b.u) *	CMSF (b.s) *	IPF Liofilizado (b.s) *
Proteína	13,0 ± 0,9	38,6 ± 1,5	92,3 ± 1,6
Lipídios	19,6 ± 0,4	60,3 ± 1,2	6,3 ± 0,3
Cinzas	0,8 ± 0,1	2,7 ± 0,3	1,6 ± 0,0
Umidade	67,7 ± 0,4	--	--

*Média dos resultados da triplicata; ± desvio padrão; b.u= base úmida; b.s= base seca; CMSF= carne mecanicamente separada de frango; IPF= isolado proteico de frango.

A composição encontrada para a CMS de frango deste trabalho está de acordo com os parâmetros exigidos pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento pela instrução normativa BRASIL nº4 de 2000, que dispõe que em base úmida a CMS de frango deve apresentar um mínimo de 12% de proteína e máximo de 30% de gordura.

Com os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se verificar que comparando-os com trabalhos de MASSINGUE [19] apresentando os valores obtidos para os atributos da composição proximal química de 67,57% de umidade, 13,23% de proteína, 17,61% de lipídios e 0,58% de cinzas, que os resultados são próximos aos encontrados. No que se refere ao isolado proteico (IPF) liofilizado da carne mecanicamente separada de frango, pôde-se verificar que foi obtido o isolamento das proteínas de forma bem sucedida, conforme relatado na Tabela 2. Os resultados obtidos para proteína corresponderam a 92,3%, confirmando a utilização deste método como fundamento para recuperação de proteínas de determinadas matérias primas. Há relatos na literatura, entretanto, que não encontram valores tão adequados quanto os deste trabalho, pode-se verificar também que houve redução significativa do teor de lipídios e cinzas.

3.2 Caracterização dos filmes

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da caracterização dos filmes de bioativos nanocompósitos.

TABELA 2- Propriedades da filmes proteicos controle (PP), e os incorporados com a montmorilonita modificada (P30B)

Propriedades	PP	P 30b 0,5%	P 30b 0,75%
Espessura (mm)	0,085 ± 0,003 ^a	0,085 ± 0,004 ^a	0,088 ± 0,004 ^a
RT (Mpa)	5,16 ± 0,87 ^c	7,57 ± 0,27 ^b	14,08 ± 0,90 ^a
ER (%)	3,66 ± 0,65 ^a	3,85 ± 0,75 ^a	3,34 ± 0,16 ^a
Solubilidade (%)	23,68 ± 0,63 ^a	22,02 ± 0,42 ^a	16,27 ± 0,99 ^b
PVA (gmm.m ² dkPa ⁻¹)	14,72 ± 0,63 ^a	12,37 ± 0,79 ^b	11,83 ± 1,05 ^b

PP: proteína + glicerol; P30b: proteína + glicerol + 0,5% ou 0,75% de nanoargila; RT= resistência a tração; ER: alongação até ruptura; PVA: permeabilidade ao vapor de água; * média das triplicatas; ±: desvio padrão; Letras iguais na mesma linha indica que não há diferença significativa (p> 0,05).

3.3 Espessura

A espessura dos filmes de proteínas relatados na Tabela 2 variaram de 0,085 a 0,088 mm, e não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Considerada um parâmetro que influencia em diversas propriedades como as mecânicas, cor, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água, se faz necessário um controle da espessura para que os filmes mantenham um padrão, a fim de serem comparados, logo se pode afirmar que houve um efetivo controle no processo.

3.4 Resistência a Tração e Alongação à Ruptura

A RT e ER dos filmes proteicos controle (PP) conforme apresentados na Tabela 2 foram de 5,16% e 3,66% respectivamente. Entretanto ao adicionar a nanoargila modificada os filmes proteicos obtiveram um aumento significativo (p<0,05) no valor de resistência a tração, sendo que para os adicionados de 0,5% de nanoargila modificada, houve um aumento correspondente a 47%, e os incorporados com 0,75% quase triplicaram os valores padrões. NAKASHIMA, CHEVALIER e CORTEZ-VEJA [23] também avaliaram o efeito da montmorilonita em filmes de colágeno adicionados de óleo essencial de cravo da Índia, variando suas concentrações entre 0,2 a 0,8% de montmorilonita. Entretanto, os resultados de resistência à tração de 5,1 a 14,2 Mpa variando positivamente, sendo que os filmes que obtiveram resultados promissores

para comparação utilizaram concentrações de montmorilonita e glicerol próximas deste trabalho. No que diz respeito à alongação dos filmes (E%) não houveram diferenças significativas nos resultados, esse efeito pode ser considerado positivo visto que a montmorilonita não afetou a matriz dos polímeros negativamente.

3.5 Solubilidade e Permeabilidade ao vapor de água

Através dos valores de solubilidades dos filmes proteicos apresentados na Tabela 2, é possível observar que a montmorilonita provoca a redução da solubilidade dos filmes, entretanto, não houve diferença significativa entre os filmes PP e P30b 0,5%, indicando que a adição nessa concentração pode não ter sido suficiente para a matriz se manter estável em contato com a água. ECHEVERRÍA, EISENBERG e MAURI [12] avaliaram filmes de proteína de soja com diferentes concentrações de montmorilonita (2,5; 5; 7,5; 10 g/100g) e seu efeito nas propriedades físicas. No que diz respeito à solubilidade, esta apresentou uma redução conforme o aumento da concentração de nanoargila, os valores de redução variaram de 51 a 33%, sendo que houve uma redução de 65% entre os filmes padrão e o filme com a concentração maior que seria 10% de nanoargila.

A permeabilidade dos filmes proteicos está apresentada na Tabela 2, onde a incorporação da nanoargila modificada influenciou significativamente ($p < 0,05$), reduzindo a permeabilidade dos filmes; entretanto nas duas concentrações de montmorilonita não houve diferença significativa nos valores de redução. ROCHA et al. [27] que caracterizaram filmes de isolado proteico de Anchoita (*Engraulis anchoita*) acrescidos de ácidos orgânicos sórbico e benzoico, onde o valores de permeabilidade variaram de 14,9 a 21,0 g.mm (m² d kPa)⁻¹. Estes autores atribuíram a taxa de permeação alta justificando que geralmente filmes à base de proteínas de pescado, tendem a apresentar maior afinidade ao vapor de água, visto o número de aminoácidos polares presentes na composição das proteínas.

3.6 Cor e opacidade

A Tabela 3 apresenta os parâmetros de cor e opacidade. É possível notar que os filmes proteicos no parâmetro luminosidade, que representa o quanto uma amostra é clara ou escura, variando numa escala de 0 (preto) a 100 (branco), tenderam ao branco, apresentando valores que não variaram significativamente entre si. Para os parâmetros a* os valores tenderam ao verde apresentando resultados negativos de -1,69 a -2,26, onde os filmes proteicos padrão (PP) apresentaram o maior valor de tendência ao verde, entretanto não apresentou diferença significativa entre os

adicionados de 0,5% de nanoargila. Os filmes incorporados com 0,75% de nanoargila diferiram significativamente do padrão, onde ocorreu uma leve redução da tendência ao verde. Para os dados de b^* que refere a intensidade ao amarelo, os resultados não apresentaram diferença significativa entre si, sendo que todos apresentaram tendência ao amarelo.

TABELA 3- Cor e opacidade dos filmes proteicos ativos nanocompósitos.

Amostras	Parâmetros			
	L*	a*	b*	Opacidade (%)
PP	88,53 ± 0,69 ^a	-2,26 ± 0,07 ^b	24,82 ± 1,69 ^a	12,29 ± 0,01 ^c
P 30b 0,5%	88,11 ± 0,91 ^a	-1,96 ± 0,15 ^{ab}	25,10 ± 0,82 ^a	13,29 ± 0,26 ^a
P 30b 0,75%	89,00 ± 0,80 ^a	-1,69 ± 0,19 ^a	24,01 ± 1,40 ^a	12,76 ± 0,13 ^b

Letras iguais na mesma coluna significam que não houve diferença significativa. PP= proteína padrão; P 30b 0,75%= filmes proteicos incorporados com 0,75% de nanoargila modificada. *Média das triplicatas ± desvio padrão.

As opacidades dos filmes proteicos tiveram diferença significativa entre si, onde os filmes padrões tiveram 12,29%, os filmes continham 0,5% de nanoargila corresponderam a 13,29% e por fim os filmes com concentração de 0,75% apresentaram 12,76% de opacidade. A opacidade dos filmes é um fator importante para sua aplicação, sendo que quanto menor sua opacidade, maior o seu nível de transparência. ZAVAREZE et al. [33] elaboraram filmes de proteínas de pescado e, também verificou luminosidade tendendo ao branco, visto que a matéria prima também apresenta uma coloração próxima ao branco. A opacidade dos filmes variou de 12,0 a 13,5, e também concorda com os resultados deste trabalho.

3.7 Caracterização morfológica dos filmes bioativos nanocompósitos.

3.7.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 1 apresenta as micrografias dos filmes proteicos bioativos nanocompósitos. Na microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2000 vezes, pode-se visualizar as diferenças morfológicas dos filmes obtidos a partir de isolado proteico de frango (IPF), e dos respectivos incorporados de nanoargilas nas duas concentrações de trabalho. Como exposto na Figura (1a) a estrutura do filme de proteína padrão dispõem-se homogênea, compacta, sem aglomerados demonstrando a interação do IPF com o agente plastificante glicerol. Nas Figuras (1b) e (1c) pode-se

verificar na estrutura a presença de grânulos, esses representam aglomerados de nanoargila, porém a matriz apresenta livre de bolhas de ar, uniforme e sem a presença de rachaduras indicando a boa interação da MMT e o polímero.

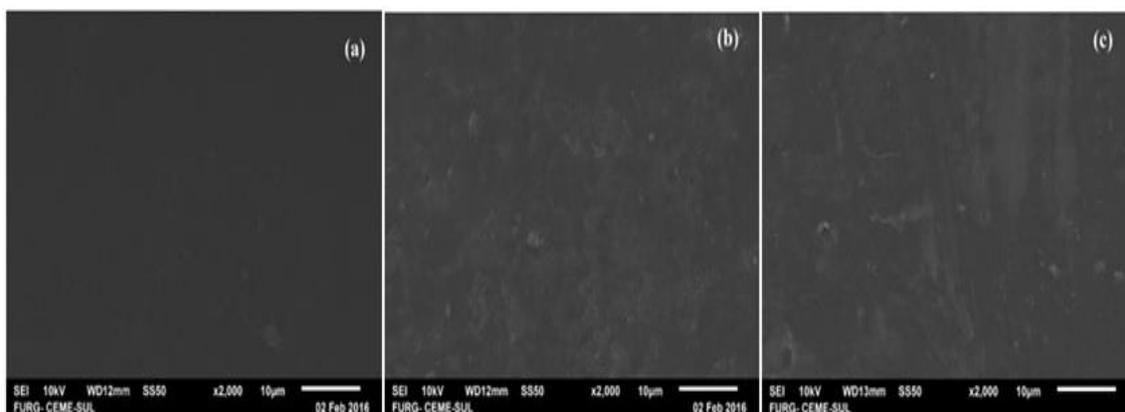


FIGURA 1 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes proteicos incorporadas com montmorilonita modificada. (a) filmes padrões de proteína, (b) filmes proteicos adicionados de montmorilonita modificada em uma concentração de 0,5% e (c) filmes proteicos adicionados de 0,75% montmorilonita modificada.

SANTOS [29] desenvolveu e caracterizou filmes nanocompósitos de araruta (*Maranta arundinacea*) e montmorilonita. Na avaliação da microscopia eletrônica de varredura, o autor também percebeu uma superfície lisa e homogênea com ausência de rachaduras ou bolhas nos filmes produzidos com fécula de araruta, glicerol e MMT, o que é um indicativo da compatibilidade entre os três componentes da formulação.

3.8 Avaliação da bioatividade

3.8.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes e blendas realizada pelo método de difusão em ágar estão apresentados na Tabela 4, sendo como gram-positivo *Staphylococcus aureus* e gram-negativo *Escherichia coli*. Esses microrganismos testados possuem uma forte incidência de casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAS).

TABELA 4- Atividade antimicrobiana dos filmes e blendas incorporados com nanoargila modificada (cloisite 30b).

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> *	<i>Escherichia coli</i> *
PP	S/ halo de inibição	S/ halo de inibição
P 30b 0,5%	S/ halo de inibição	S/ halo de inibição
P 30b 0,75%	31,3 ± 2,1 ^{a**}	S/ halo de inibição

PP: filme de proteína padrão; P 30b filme de proteína incorporados com montmorilonita modificada; * média das triplicatas; ±: desvio padrão; Letras iguais na mesma linha indica que não há diferença significativa ($p > 0,05$); ** Halo total de efeito bacteriostático (mm).

A Tabela 4 apresenta as medidas dos halos de inibição total, sendo que o disco de filmes que foi utilizado na análise foi de 25 mm, os resultados mostram que não houveram halos de inibição para *Escherichia coli*, e somente as filmes e blendas incorporados com 0,75% de nanoargila apresentaram halo de inibição bacteriostáticos para *Staphylococcus aureus*. A *Escherichia coli* é um microrganismo Gram – negativo, e este poderia ser uma das justificativas por não terem sido detectados esses halos, que conforme relatado por BOMONO e SZABO [5] alguns antibacterianos são insensíveis na presença de cepas Gram-negativas, pois não conseguem transpassar a membrana externa destas bactérias, dificultando assim a difusão destes para o seu interior celular, no qual compõe parte fundamental para ação de antibióticos, sanitizantes, entre outros.

A Figura 2, apresenta a imagem da amostra que apresentou halo de inibição, sendo ela para os filmes proteicos incorporados com 0,75% de nanoargila modificada.

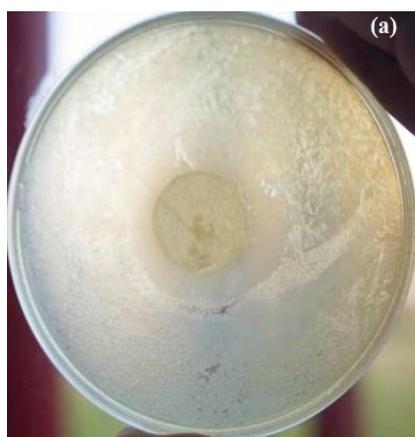


FIGURA 2 – Halo de Inibição do filme bioativo nanocompósitos na concentração de 0,75%.

Na Figura 2 está representado o halo de inibição encontrado na incorporação de 0,75% de montmorilonita, entretanto, não foi possível observar halos de inibição de efeito bactericida, ou seja, com indução da morte bacteriana. O que podemos perceber que há um halo de efeito bacteriostático que significa uma interrupção no crescimento microbiológico [15].

KANMANI and RHIM [18] elaboraram filmes nanocompósitos ativos à base de gelatina incorporados com nanopartículas de prata e nanoargila (Cloisite 30b), os microrganismos de origem patogênica testados foram *E. coli* e *L. monocytogenes*. Os autores verificaram que os filmes de gelatina e nanoargila apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, e que sua combinação com nanopartículas de prata acentuam o efeito bactericida contra *L. monocytogenes*, visto que uso individualmente das nanopartículas não apresentou resultados tão satisfatórios quanto os combinados com Cloisite 30b. Sendo assim, os resultados desses autores evidenciam o poder antimicrobiano da cloisite 30b (mesma nanoargila utilizada neste trabalho) onde os autores evidenciam o seu efeito bactericida contra bactérias gram positivas.

3.8.2 Atividade Antioxidante

Através dos resultados obtidos na caracterização e na avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes, os filmes P30b 0,75% apresentou atividade antimicrobiana e boas propriedades mecânicas. Logo, os mesmos e o padrão foram selecionados para avaliação da atividade antioxidante e aplicação.

Ao avaliar o potencial antioxidante dos filmes ambos incorporados de nanoargila Cloisite 30b na concentração de 0,75%, se obteve os seguintes valores quando determinado pelo método DPPH os filmes de proteína padrão (PP) e os com nanoargila (P30B 0,75%) apresentaram 72,15% e 66,45% de inibição respectivamente.

Para os resultados de poder redutor os filmes proteicos padrões (PP) apresentaram valores de absorvância de 0,190 e para P30b 0,75% onde absorvância foi de 0,175, não houveram diferença significativa, sendo que para ambos os casos a presença da nanoargila influencia na redução da atividade antioxidante. Não há literaturas que relatem a obtenção de filmes antioxidantes somente com nanoargila, todas apresentam a utilização de composto fenólicos, extrato com algum carreador na atividade antioxidante, entretanto no caso desse trabalho pode-se se ter relação com a quantidade de proteína disponível na matriz polimérica.

Sabe-se que as nanoargilas não apresentam a capacidade de sequestrar radicais livres e nem de reduzir ferricianeto a ferrocianeto, sendo assim a capacidade antioxidante esta relacionadas a presença do isolado proteico de frango. Outros trabalhos foram desenvolvidos em hidrolisados proteicos de pescado, frango, devido as poucas referências que tratam desse assunto, CENTENARO [7] realizou um vasto estudo e avaliou a atividade antioxidante de diferentes materiais primas de origem animal, sendo que uma dessas matérias primas foram ossos de castanha e de pescado, que apresentaram em torno de 23% de atividade de sequestro de radicais pelo método DPPH.

3.9 Aplicação dos filmes e blendas nanocompósitas antimicrobianas na conservação de lombo de suíno.

3.9.1 Contagem de Microrganismos Mesófilos e Psicotróficos.

A Tabela 5 demonstra a contagem de crescimentos dos microrganismos mesófilos, da carne de lombo suíno envolvida por 3 tipos de tratamentos, sendo eles: embalagem comercial de cloreto de polivinila (PVC), filmes proteicos padrões (PP), e os filmes nanocompósitos incorporados com 0,75% de montmorilonita modificada por sais de quaternário de amônio.

TABELA 5- Contagem de crescimento de microrganismos mesófilos (log UFC/g) das amostras de lombo suíno.

Tratamentos	Tempo (dias)*			
	3	5	7	9
Comercial PVC	2,95± 0,16 ^{abC}	4,37 ±0,05 ^{aB}	5,07 ±0,18 ^{bA}	Incontável
PP	2,72 ± 0,05 ^{bB}	4,21± 0,27 ^{aA}	5,27± 0,06 ^{bC}	6,39± 0,01 ^{cC}
P30B 0,75%	3,24 ± 0,16 ^{aC}	3,14 ±0,21 ^{bC}	5,12 ± 0,05 ^{bB}	6,09 ±0,11 ^{bA}

Letras iguais na mesma coluna significam que não houve diferença significativa. Letras minúsculas estática referente ao dia; Letras maiúscula estática referente aos dias consecutivos; Comercial PVC= embalagem de poli cloreto de vinila; PP= proteína padrão; P 30b 0,75%= filmes proteicos incorporados com 0,75% de nanoargila modificada; *Média das triplicatas ± desvio padrão.

Como pode ser visto a partir dos dados mostrados na Tabela 5, a carga total de células bactérias mesófilas aumentou gradualmente com o tempo de armazenamento para todas as amostras, sendo que no terceiro dia de armazenamento o filme

comercial de PVC, se mostrava estatisticamente igual a blenda padrão apresentando entre 2,95 – 2,72 log UFC/g, entretanto no último dia de avaliação a carne suína já se apresentava em estado de putrefação, com o odor característico e exsudação da carne, sendo que no que diz respeito a contagem microbiológica, não foi possível realizá-la, sendo incontável. Em contrapartida, os filmes desenvolvidos nesse trabalho ainda apresentavam contagens aceitáveis, PP e P30b 0,75%, o que indica uma pequena redução significativa nos resultados sugerindo o efeito bacteriostático identificado na avaliação antimicrobiana por teste difusão.

Os resultados para psicrotróficos apresentados na Tabela 6, também evidenciaram o mesmo efeito de crescimento microbiano apresentados para psicrotróficos, com aumento gradativo ao longo dos dias de avaliação e pequenas reduções significativas na contagem dos filmes e incorporados com nanoargila modificada. A legislação brasileira não determinar limites de contagem para microrganismos mesófilos e psicrotróficos, somente para *Salmonella* e Coliformes a 45°C.

TABELA 6- Contagem de crescimento de microrganismos psicrotróficos (log UFC/g) das amostras de lombo suíno.

Tratamentos	Tempo (dias)*			
	3	5	7	9
Comercial PVC	3,27 ± 0,07 ^{bc}	6,28 ± 0,05 ^{aA}	5,30 ± 0,03 ^{cB}	Incontável
PP	3,25 ± 0,05 ^{bd}	4,33 ± 0,02 ^{bc}	4,89 ± 0,10 ^{aB}	6,41 ± 0,05 ^{ca}
P30B 0,75%	3,50 ± 0,05 ^{ab}	4,27 ± 0,02 ^{bc}	4,29 ± 0,02 ^{bc}	6,32 ± 0,16 ^{b A}

Letras iguais na mesma linha ou coluna significam que não houve diferença significativa. Letras minúsculas estática referente ao dia; Letras maiúscula estática referente aos dias consecutivos; Comercial PVC= embalagem de poli cloreto de vinila; PP= proteína padrão; P 30b 0,75%= filmes proteicos incorporados com 0,75% de nanoargila modificada; *Média das triplicatas ± desvio padrão.

SIROCCH et al. [30] realizaram uma investigação sobre o aumento de vida útil em carne bovina, utilizando óleo essencial de Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), onde foram avaliados durante 20 dias em condições aeróbicas o armazenamento a 4°C. O resultados expressam que no 5º e 6º dias de armazenamento, a carne bovina já apresentava o limite máximo de contagem de microrganismos psicrotróficos aceitável para qualidade microbiológica de alimentos, este que seria 7 log UFC/g de acordo com o autor. Sendo assim com base nos nossos resultados, a carne suína

embalada com filmes ativos nanocompósitos, ainda estariam próprias para o consumo no 9º dia útil.

3.9.2 Perda de massa

A carne de lombo suíno foi embalada com 3 tratamentos, comercial (PVC), proteína padrão (PP), proteína 30b 0,75% (P 30b 0,75%). Após os 9 dias de armazenamento, os tratamentos apresentaram perda de massa a partir do 3º dia, sendo que PVC, PP, P30b, obtiveram 10; 44,5; 42,8; respectivamente de perda de massa. Como pode-se observar os filmes incorporados com nanoargila modificada apresentaram redução na perda de massa comparadas ao seu padrão. Visto que, a adição da nanoargila influenciaram nos valores de solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, dos quais se refletiram na perda de massa, onde a nanoargila ao interagir com a matriz dos polímeros, cria um caminho tortuoso para a passagem de água e oxigênio, fazendo com que o mesmos tenham mais dificuldade de transporte para o meio exterior. Todavia, mesmo com essa influência da nanoargila, os filmes e as blendas não superaram a embalagem sintética de PVC, no qual apresentou 10% de perda de massa. CORTEZ-VEGA, BAGATINI e SOUZA [11] avaliaram a perda de massa de mamão minimamente processado envolto por cobertura nanocompósita, proveniente de isolado proteico de corvina e montmorilonita organofílica, onde também encontrou uma redução da perda de massa ao incorporar montmorilonita na solução de cobertura dos mamões.

4. CONCLUSÃO

Este estudo consolidou o processo de obtenção de isolado proteico de carne mecanicamente separada de frango, apresentando valores consideravelmente altos de proteína (92,2%), possibilitando o desenvolvimento de filmes proteicos, e sua mistura com ágar, apresentando boa compatibilidade entre esses polímeros. Independente da concentração de nanoargila, os resultados para resistência a tração, alongação e solubilidade apresentaram-se satisfatório, pois ocorreu um aumento significativo e positivo dessas propriedades. Nas análises bioativas antimicrobiana, o filme com a maior concentração de nanoargila apresentou halo de inibição de efeito bacteriostático e, também potencial antioxidante. Por fim pode-se indicar que os filmes proteicos bioativos com nanoargila, obtiveram êxito nos seus desenvolvimentos e podem ser

aplicadas em diversos alimentos de acordo com as características que o mais favorecerem.

REFERÊNCIAS

- [1] AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis. 17^a edição. Maryland, USA. AOAC, 2000.
- [2] ASTM. Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. In: **Annual Book of American Society for Testing and Material**, Designation D882-91. Philadelphia, USA, 1996.
- [3] ASTM. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Thin Plastic Sheeting. In: **Annual Book of American Society for Testing and Material**, Designation E96-95, Philadelphia, USA, 1995.
- [4] AZEVEDO, V.M. **Desenvolvimento de nanocompósitos de isolado proteico de soro de leite incorporados com agente antiescurecimento**. 92p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- [5] BOMONO R.A.; SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species, *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 49-56, 2006.
- [6] CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing pAminobenzoic or sorbic acids. **Food Microbiology and Safety**, v. 66, p. 865-870, 2001.
- [7] CENTENARO S.G. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. 158p. Tese, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande/RS, Brasil, , 2011.
- [8] CIE. **Colorimetry. Publication CIE 15.2.2**. ed. Wien, Austria. Commission International de l'Éclairage, 1986.
- [9] CLSI- Clinical laboratory standards institute. Document M2-A8 – **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**; Approved Standard – Eight Edition. v. 23, n. 1, 2003.
- [10] CORTEZ-VEGA, W.R. **Desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) e argilas organofílicas**. 139 p. Tese, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil, 2011.
- [11] CORTEZ-VEGA, W.R.; BAGATINI D.C.; SOUZA, J.T.A. 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, 2014.

- [12] ECHEVERRÍA I., EISENBERG P., MAURI A.N. Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. **Journal of Membrane Science**, v. 449, p. 15 -26, 2014.
- [13] GONÇALVES, R.M.; GONÇALVES, J.R.; GONÇALVES, R.M.; OLIVEIRA, R.R.; OLIVEIRA, R.A.; LAGE, M.E. Avaliação físico-química e conteúdo de metais pesados em carne mecanicamente separada de frango (CMSF) e de bovino produzidas no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 553-559, 2009.
- [14] GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glycerol as plasticers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 206-211, 1992.
- [15] HARRIS C.R.; THORARENSEN, A. Advances in the discovery of novel antibacterial agents during the year. **Current in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2213-43, 2004.
- [16] HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.; SEÑORÁNS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, p. 417-423, 2005.
- [17] HUA, Y.; HUANG, Y.; QIU, A.; LIU X. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes. **Food Research International**, v. 38, p. 273-279, 2005.
- [18] KANMANI P.; RHIM J.W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 644-652, 2014.
- [19] MASSINGUE A.A.; **Uso de carne mecanicamente separada de aves na elaboração de mortadelas à base de carne de cordeiros e de ovelhas**. 105p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2012.
- [20] MENEZES, B.S. **Obtenção e avaliação de filmes nanocompósitos antimicrobianos com isolado proteico de frango e nanoargilas**. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil, 2013.
- [21] MORAES, A.R.F.; VIDIGAL, M.C.T.R.; SOARES, N.F.F.; MORAES, L.P.; MELO, N. R.; GONÇALVES, M. P. J. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano aromatizado para aplicação em massa de pastel. **Ciência Rural**, v. 41, p. 537-543, 2011.
- [22] MORAES, A.R.F.; GOUVEIA, L.E.R; SOARES, N.F.F.; SANTOS, M.M.S.; GONÇALVES, M.P.J.C. Development and evaluation of antimicrobial and flavored film for using on pastry dough. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 33-36, 2007.
- [23] NAKASHIMA A.Y.; CHEVALIER R.C.; CORTEZ-VEJA W.R.; Desenvolvimento e caracterização de filmes de colágeno com adição de óleo essencial de cravo-da-índia. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 03, n. 1, p. 50-57, 2016.
- [24] NOLSOE; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food Bioprocess and Technology**, v. 2, p. 1-27. 2009

- [25] 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.
- [26] OYAZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.
- [27] ROCHA M.; LOIKO R.M.; TONDO C. E.; PRENTICE, C. Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 213-220, 2014.
- [28] ROCHA, M.; LOIKO, M.R.; GAUTÉRIO, G.; TONDO, E.C.; PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666-673, 2013.
- [29] SANTOS, W. J. **Desenvolvimento e caracterização de filmes nanocompósitos de araruta (*Maranta arundinacea*) e montmorillonita**. 79p. Dissertação em Engenharia Química – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, 2014.
- [30] SIROCCHI, V.; DEVLIEGHERE, F.; PEELMAN, N. , SAGRATINI, G., MAGGI, F.; VITTORI, S.; RAGAERT, P. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. **Food Chemistry**, v. 221, p.1069-1076, 2017.
- [31] SOUZA, C.O; SILVA, L.T.; DRUZIAN, J.I. Comparative studies on the characterization of biodegradable cassava starch films containing mango and acerola pulps. **Química Nova**, v.35, p. 262-267, 2012.
- [32] WENG, C.J.; DENG, J. Y.; LIN, J.; LING C.; Cloning, Expression and characterization of UDP-Glucose pyrophosphorylase from shoots of *Bambusa oldhamii*. **The Journal of Biochemistry**, 2009.
- [33] ZAVAREZE, E.R.; EL HALAL, S.L.M.; SILVA, R.M.; DIAS, A.R.G.; PRENTICE, C. Mechanical, barrier and morphological properties of biodegradable films based on muscle and waste proteins from the Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1-9, 2013.
- [34] ZINOVIADOU, K.G.; KOUTSOUMANIS K.P.; BILIADERIS, C.G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 10, p. 234-245, 2009.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento e bolsa concedidos.