

Área: Tecnologia de Alimentos

PROPRIEDADES MECÂNICAS E ANTIMICROBIANAS DE FILMES PROTÉICOS INCORPORADOS COM ÁCIDO BENZÓICO

Meritaine da Rocha^{1*}, Michele Moraes de Souza¹, Márcia Regina Loiko², Eduardo César Tondo², Carlos Prentice¹

¹Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

²Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

*E-mail: meriportela@yahoo.com.br

RESUMO – Os filmes são produzidos a partir de macromoléculas como os polissacarídeos, lipídeos e proteínas, e devido a suas características podem ser utilizados como embalagens. As proteínas estão sendo largamente estudadas, pois possuem uma estrutura com 20 monômeros diferentes, que confere um amplo potencial de ligações intermoleculares importantes para a formação dos filmes. A incorporação de agentes ativos em filmes é uma alternativa como embalagem ativa, para inibir ou retardar a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos. Em face disso, os objetivos do presente estudo foram avaliar as propriedades mecânicas e antimicrobianas contra *Listeria monocytogenes*, e *Salmonella* Enteritidis pelo método de difusão em discos de filmes de isolado protéico de anchoita (*Engraulis anchoita*) incorporados com 0, 0,75 ou 1,50% (p/v) de ácido benzóico. A maior atividade antimicrobiana frente à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis foi verificada para filmes acrescidos de 1,50% de ácido benzóico. Por outro lado, os filmes controle não apresentaram efeito inibitório para as diferentes bactérias patogênicas testadas. O aumento da concentração de 0% para 1,50% do ácido orgânico estudado resultou na diminuição da resistência à tração e aumento da elongação até a ruptura e na espessura dos filmes. Estes resultados sugerem que os filmes a base de isolado protéico de anchoita incorporados com ácido benzóico podem ser utilizados para promover a segurança e qualidade dos alimentos, embora as propriedades mecânicas devam ser melhoradas.

Palavras-chave: Proteína, filmes, antimicrobianos.

1 INTRODUÇÃO

O interesse em filmes biodegradáveis nas últimas décadas ocorre devido a preocupações com o meio ambiente e a necessidade de minimizar o uso de embalagens sintéticas, bem como a demanda dos consumidores

por produtos alimentares seguros e de vida útil prolongada (PIRES et al., 2013). Os filmes são produzidos basicamente a partir de macromoléculas capazes de formar matrizes contínuas e coesas. Proteínas, lipídeos e polissacarídeos foram utilizadas para a elaboração de filmes em diversos estudos (OJAGH et al., 2011; SAYANJALI et al., 2011; ROCHA et al., 2013).

As proteínas possuem uma estrutura à base de 20 monômeros diferentes, o que lhes confere uma ampla capacidade de formar ligações intermoleculares em posições diferentes, oferecendo um potencial para a formação de numerosas ligações importantes na elaboração dos filmes (OU et al., 2005). Filmes de diversas fontes proteicas tais como soro de leite, pescado e soja largamente estudados (EMIROGLU et al., 2010; RAMOS et al., 2012). As proteínas miofibrilares de pescado despertam interesse devido a necessidade de uso de espécies de subutilizadas. A anchoita (*Engraulis anchoita*) é uma espécie pelágica pouco explorada no Brasil, que pode ser utilizada como fonte proteica para elaboração de filmes biodegradáveis. Os filmes protéicos oferecem barreira ao oxigênio, boas propriedades mecânicas e, além disso, com a adição de agentes antimicrobianos podem atuar como filmes ativos (ROCHA et al. 2013).

O uso de filmes contendo agentes antimicrobianos possui vantagens em relação aos métodos tradicionais de adição direta de conservantes nos alimentos, pois podem ser liberados de maneira controlada, estando, portanto, em menor quantidade no alimento e atuando na superfície do mesmo. Também pode ocorrer a inibição ou redução da atividade do antimicrobiano, quando adicionado de forma tradicional, por diversas constituintes do alimento (KRISTO et al., 2008). Os ácidos orgânicos, tais como o ácido benzóico, são GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) pela Food and Drug Administration (CAGRI et al., 2001). Segundo Maní-López et al. (2011) os ácidos orgânicos afetam a atividade microbiana por acidificação citoplasmática e acúmulo de ânions em níveis tóxicos.

Manab et al. (2011) e Cagri et al. (2001) em seus estudos verificaram que filmes a base de isolado protéico de soro de leite, incorporados com ácido sórbico e ácido benzóico inibiram a multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. Pesquisas têm demonstrado eficiência dos filmes também contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonellas*, coliformes, bactérias psicrotróficas entre outras. O *S. aureus* é um micro-organismo frequentemente envolvido em surtos de toxiose alimentar e está associado à manipulação inadequada dos alimentos, uma vez que é comumente encontrado na pele e mucosas do trato respiratório (WANG et al., 2007). A *L. monocytogenes* é um micro-organismo que tem capacidade de multiplicação em uma faixa ampla de temperatura, de 1 a 45 °C podendo sobreviver nos alimentos por um longo período (JAY, 2005). Segundo Rantsiou et al. (2011) ela passou a chamar a atenção como um patógeno veiculado por alimentos quando a refrigeração se estabeleceu como um processo de conservação em toda a cadeia de alimentos, com o objetivo de prolongar a vida útil dos alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Foi utilizado um isolado protéico de anchoita contendo 88,8% de proteína, obtido pelo método de variação de *pH* segundo Rocha et al. (2013), a partir de carne mecanicamente separada de anchoita capturada em cruzeiros realizados pelo Navio Oceanográfico Atlântico Sul, na zona costeira do sul do Brasil. As linhagens bacterianas *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* foram cedidas da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2.2 Elaboração dos filmes antimicrobianos

Os filmes antimicrobianos foram obtidos por *casting* segundo metodologia descrita por Cagri et al. (2001) e Rocha et al. (2013). As soluções filmogênicas foram obtidas pela dispersão de 3,0 g de IPA, 30 g de glicerol/ 100 g de IPA em 100 mL de água destilada em pH 11,5 a 74 °C durante 30 min. Após o arrefecimento, foram adicionados 0,75% ou 1,5% (p/v) de ácido benzóico (AB) e o pH ajustado para 5,2. Como controle foi utilizado filme sem adição de AB, solubilizado em pH 11,5. Aproximadamente 25 mL da solução filmogênica foi espalhada em placas de Petri e desidratada a 35°C durante 16 horas. Após os mesmos foram condicionadas em dessecadores contendo sílica durante 48 horas a 25 °C para posterior caracterização.

2.3 Caracterização dos filmes antimicrobianos

Foi determinada em micrômetro digital (Insize, IP54, São Paulo, Brasil). Foram realizadas dez medidas aleatórias sobre a superfície do filme e a média das mesmas foi utilizada para cálculo da resistência a tração.

Foram determinadas em triplicata a resistência à tração e a alongação até a ruptura dos filmes, segundo metodologia da ASTM D882-91 (1996), utilizando um texturômetro TA.XT_{plus} (Stable Micro Systems). As amostras foram cortadas em forma de retângulos (80 x 25 mm) e fixadas em garras com separação inicial de 50 mm e velocidade de tração de 0,8 mm/s. A resistência a tração foi calculada dividindo-se a força máxima no rompimento do filme, pela área de secção transversal. A alongação até ruptura foi determinada dividindo-se a distância final de separação da “probe” pela distância inicial de separação das garras (50 mm), multiplicada por 100.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de IPA incorporados com diferentes concentrações de ácido benzóico frente aos micro-organismos *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* foi realizada em triplicata através do método de difusão em discos segundo a CLSI (2003). A cultura de *S. Enteritidis* foi cultivada e inoculada em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e a da *L. monocytogenes* inoculadas em caldo BHI enriquecido com extrato de levedura 0,6% (p/v) (Yest Extract). Após 24 horas, as culturas foram padronizadas com uma

densidade de células de 1 a 2×10^8 UFC/ mL (McFarland 0,50). Um suabe estéril foi imerso na suspensão padronizada e brevemente espalhada sobre a superfície da placa de ágar Mueller-Hinton (MH). Os filmes foram assepticamente cortados em discos de 15 mm e adicionados à placa contendo o ágar MH inoculado com os diferentes micro-organismos. As placas foram incubadas invertidas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. O halo total de inibição foi mensurado perpendicularmente, incluindo o diâmetro do disco, em mm e o resultado final foi expresso como a média de três medições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a espessura, resistência a tração e alongação até a ruptura dos diferentes filmes elaborados. Os filmes controle apresentaram uma resistência a tração maior e uma alongação menor quando comparados aos filmes com a adição de ácido benzóico. O acréscimo da adição de ácido benzóico de 0,75% para 1,50% resultou em uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na resistência a tração dos filmes. Entretanto, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na alongação e na espessura dos respectivos filmes.

Tabela 1 – Propriedades dos filmes com e sem adição de ácido benzóico

Ácido benzóico (%)	Espessura (mm)	Resistência a tração (MPa)	Elongação até a ruptura (%)
0	$0,150 \pm 0,050^c$	$3,90 \pm 0,01^a$	$9,00 \pm 1,80^c$
0,75	$0,200 \pm 0,001^b$	$2,00 \pm 0,01^b$	$57,97 \pm 0,11^b$
1,50	$0,217 \pm 0,001^a$	$1,21 \pm 0,18^c$	$97,66 \pm 2,08^a$

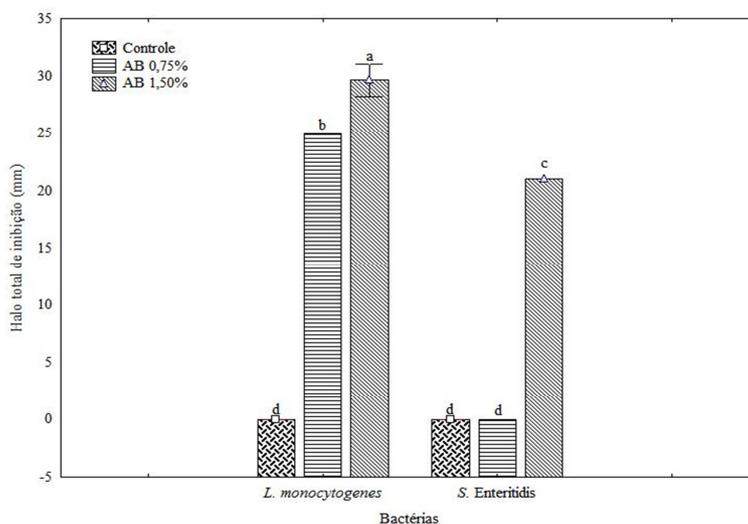
Média + desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Cagri et al. (2001) verificaram que a incorporação de diferentes ácidos orgânicos, reduziram a resistência a tração e aumentaram a alongação dos filmes. O ácido benzóico oferece maior mobilidade entre as cadeias de proteína, fazendo com que o filme apresente menor resistência a tração e maior flexibilidade quando comparado ao filme controle. Segundo Shimazu et al. (2007) com o aumento no teor de sólidos totais secos adicionados na solução filmogênica, tal como o aumento do conteúdo dos antimicrobianos, resulta em um acréscimo na espessura do filme.

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes realizada pelo método disco difusão, com e sem incorporação de ácido benzóico são apresentados na Figura 1. Os resultados obtidos demonstraram que os filmes controle não promoveram inibição na multiplicação dos micro-organismos testados. Com o acréscimo da incorporação de ácido benzóico no filme de 0,75% para 1,50% houve um aumento significativo no halo total de inibição. A *S. Enteritidis* foi inibida pela maior concentração do ácido orgânico utilizado, mas não foi inibida pelo menor nível desse agente. A *L. monocytogenes* é um bactéria Gram-positiva, que possui uma parede celular composta por grossas camadas de peptidoglicano (20 a 80 nm) depositada sobre membrana citoplasmática. Essa substância é responsável pela morfologia das bactérias e também pela sua resistência a

fatores físicos como pressão, congelamento entre outros, mas sensíveis aos agentes químicos (JAY, 2005; TONDO e BARTZ, 2011). Segundo Jay (2005) alguns antibacterianos são inativos frente a cepas Gram-negativas, pois não conseguem ultrapassar a membrana externa destas bactérias, pois estas dificultam a difusão destes para o seu alvo no interior celular ao qual se constitui em um fator primordial para ação desses.

Figura 1- Atividade antimicrobiana de filmes a base de isolado protéico de anchoita com ou sem incorporação de ácido benzóico. Letras minúsculas iguais para o mesmo micro-organismo indicam que não há diferença significativa, entre os diferentes tratamentos.



Segundo Mani-López et al. (2011) a inibição da multiplicação dos micro-organismos por ácidos orgânicos, ocorre devido a liberação de prótons no citoplasma e o acúmulo de ânions, que fazem com que a velocidade da síntese de macromoléculas seja diminuída, afetando o transporte de nutrientes através da membrana celular.

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a incorporação de um agente antimicrobiano em diferentes concentrações, apresentou diferentes graus de eficácia frente aos micro-organismos alvo. As propriedades dos filmes a base de isolado protéico foram afetadas pela adição de diferentes concentrações de ácido benzóico. Os filmes com maior incorporação desse ácido orgânico apresentaram maior alongação até a ruptura e espessura quando comparados ao filme controle. Todavia, foi observada uma diminuição na resistência a tração com o acréscimo do agente antimicrobiano nos filmes. Os filmes controle não apresentaram efeito inibitório para as bactérias testadas. Contudo, a maior atividade antimicrobiana dos filmes foi demonstrada contra *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* para filmes incorporados com o maior conteúdo de ácido benzóico.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio para o desenvolvimento dessa pesquisa.

6 REFERÊNCIAS

- CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Food Microbiology and Safety**. v. 66, p.865-870, 2001.
- EMIROGLU, K. Z.; YEMIS, G. P.; COSKUN, B. K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**. v. 86, p.283–288, 2010.
- JAY, J.M.; **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.
- KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**. v. 22, p.373–386, 2008.
- MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**. v.45, p.713-721, 2011.
- 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**. 122, 161-166, 2011.
- RAMOS, O. L.; SANTOS, A. C.; LEÃO, M. V.; PEREIRA, J. O.; SILVA, S. I.; FERNANDES, J. C.; FRANCO, M. I.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. **International Dairy Journal**. v.25, p.132-141, 2012.
- ROCHA, M.; LOIKO, M. R.; GAUTÉRIO, G. V.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**. v.116, p.666–673, 2013.
- SAYANJALI, S.; GHANBARZADEH, B.; GHIASSIFAR, S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. **LWT - Food Science and Technology**. v.44, p.1133-1138, 2011.
- SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 28, p. 79-88, 2007.
- TONDO, E.C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**, Porto Alegre: Editora Sulina, 2011. 263 p.