



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

WAGNER BARRETO DA SILVA

**PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS E ANTIMICROBIANA DE  
BIOFILMES DE PROTEÍNAS DE PEIXE COM ÓLEO ESSENCIAL  
DE CRAVO.**

Belém - Pará

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

WAGNER BARRETO DA SILVA

**PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS E ANTIMICROBIANA DE  
BIOFILMES DE PROTEÍNAS DE PEIXE COM ÓLEO ESSENCIAL  
DE CRAVO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientação:** Prof. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço.

**Co-Orientação:** Prof. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima.

Belém - Pará

2018

WAGNER BARRETO DA SILVA

**PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS E ANTIMICROBIANA DE  
BIOFILMES DE PROTEÍNAS DE PEIXE COM ÓLEO ESSENCIAL  
DE CRAVO.**

Avaliada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientadora)

---

Prof. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Co-Orientadora)

---

Prof. Dr. Éder Augusto Furtado Araujo  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Externo)

---

Prof. Dra. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

---

Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo  
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Membro - Suplente)

*“Tão boa é a sabedoria como herança, e dela tiram proveito os que veem o sol. Porque a sabedoria serve de sombra, como de sombra serve o dinheiro, mas a excelência da sabedoria é que ela dá vida ao seu possuidor.”*

**Livro do Eclesiastes 7: 11-12**

Agradeço...

Ao meu Deus, pois tudo que fiz e conquistei foi através de suas eternas misericórdias, Sua graça me basta.

À meus pais que foram usados por Deus para que eu tivesse boa educação e bons valores. Edivaldo e Eliana Silva fizeram de tudo para que eu seguisse no caminho do bem, do conhecimento e da honestidade. Vou tê-los sempre em minhas memórias.

À minha avó Terezinha Reis pelos ensinamentos e sábios conselhos que me ajudam a entender a vida e como lidar com ela.

À Nathália Nogueira, minha esposa, que sempre me incentivou a alcançar lugares mais altos, aos estudos e ser melhor a cada dia. Uma amiga de verdade.

Aos meus filhos, Maria Eduarda e Benjamim, que mesmo pequenos me ajudam a crescer e ser um homem responsável.

À minha família pelo apoio em todos os momentos na minha jornada acadêmica.

À minha orientadora Prof. Dra Lúcia Lourenço, pessoa a qual respeito por seu trabalho e determinação em fazer com que seus orientados aprendam a ser bons profissionais. Por ter destinado a mim sua confiança e paciência.

À minha co-orientadora Prof. Dra Consuelo Lima que me ajudou com seus conhecimentos admiráveis para engrandecer ainda mais nosso trabalho.

A meu amigo Adriano Lucena por seus grandiosos conselhos e companheirismo, pessoa enviada por Deus para minha vida.

Às minhas amigas Jáira Thayse e Cleideane Araújo que me ajudaram nos momentos de “desesperos” no laboratório, que contribuíram com sugestões e seus conhecimentos.

À Lorena Vieira que passou comigo no processo seletivo e acabou se tornando uma grande amiga durante o mestrado, e que pretendo levar por toda a vida.

Aos companheiros do LAPOA que sempre fizeram o possível para que os dias de pesquisas em laboratório não fossem chatos e monótonos.

À meus amigos Jean, Rayane, Yamila, Clesia, Renan e Adriane, pelos momentos de alegria e dificuldades, pois juntos sonhamos alcançar nossos objetivos.

À meu amigo Victor Hugo que me apoiou, ensinou e ajudou a conquistar meu objetivo durante o período de conclusão do mestrado.

Ao PPGCTA e a CAPES pela oportunidade, infraestrutura e o apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I</b> .....	11
<b>1.REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1. DOURADA ( <i>Brachyplatysoma roussauxii</i> ) .....	11
1.2. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DO PESCADO.....	11
1.3. PROTEÍNAS MIOFIBRILARES .....	13
1.4 COLÁGENO E GELATINA.....	13
1.5 EXTRAÇÃO DE GELATINA.....	14
1.6. PLASTIFICANTE.....	15
1.7. BIOFILMES ATIVOS.....	16
1.8 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS .....	18
<b>1.8.1 Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de cravo.....</b>	19
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	20
<b>CAPÍTULO II - Artigo</b> .....	29
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>ABSTRACT</b> .....	29
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
<b>Obtenção das proteínas miofibrilares</b> .....	31
<b>Elaboração dos biofilmes de proteínas miofibrilares</b> .....	32
<b>Elaboração dos biofilmes de gelatina</b> .....	32
<b>Propriedades dos biofilmes</b> .....	32
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>Agradecimentos</b> .....	44
<b>Literatura Citada</b> .....	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1:</b> Microfotografias da superfície dos biofilmes de proteína miofibrilar com óleo essencial de cravo, com ampliação de $\cong 2.000$ x. A (F1); B (F2); C (F3); D (F4).	38
<b>Figura 2.</b> Microfotografias da superfície dos biofilmes de gelatina com adição de óleo essencial de cravo, com ampliação de 3.000 x: A (F1); B (F2); C (F3); D (F4).	41
<b>Figura 3.</b> Projeção das medições de biofilme produzido com proteínas miofibrilares (A) e gelatina (B) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais.	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Páginas</b>
<b>Tabela 1:</b> Resultados das análises dos biofilmes de proteínas miofibrilares (PM) com adição de óleo essencial de cravo (OEC).	36
<b>Tabela 2:</b> Resultados das análises dos biofilmes de gelatina com adição de óleo essencial de cravo (OEC).	39
<b>Tabela 3:</b> Atividade antimicrobiana para biofilmes incorporados de óleo essencial de cravo.	42



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antimicrobiana de biofilmes elaborados com proteínas retiradas de resíduos de filetagem de dourada (*Brachyplatysoma roussauxii*) adicionados com óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*), além de analisar as propriedades tecnológicas dos filmes. Foram elaborados dois biofilmes, um com 2% de proteínas miofibrilares extraídas de aparas de filetagem e outro com 2% de gelatina da pele de dourada, pelo método de *casting*. As concentrações de óleo essencial de cravo foram de 0% (branco), 1%, 1,5% e 2% em relação ao volume de solução. Nos filmes foi avaliada a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão e também foram feitas análises mecânicas (alongação e resistência à tração), de barreira (permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água e índice de intumescimento), espessura, cor e características morfológicas e estruturais através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As proteínas miofibrilares e as gelatinas extraídas das aparas e pele de dourada são excelentes matérias prima para aplicação em biofilmes, com teor proteico de 94,92% e 79,67 % e rendimento de 14,10% e 32,92%, respectivamente. Os biofilmes adicionados de óleo essencial de cravo apresentaram excelentes valores de permeabilidade a vapor d'água e altos valores de alongação contribuindo para melhor aplicação em alimentos, assim como apresentou coloração amarela com baixa intensidade. Os biofilmes de proteínas miofibrilares apresentaram efeito inibitório nas concentrações utilizadas frente às bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Os biofilmes de gelatina adicionados de OEC não inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras-chave: biofilme; gelatina; proteínas miofibrilares; resíduos da indústria.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial capacity of biofilms elaborated with proteins extracted from filleting residues of gilt (*Brachyplatysoma roussauxii*) added with essential oil of clove (*Eugenia caryophyllata*), besides analyzing the technological properties of the films. Two biofilms were prepared, one with 2% of myofibrillar proteins extracted from fillets and the other with 2% of gelatin of the skin of gilt, by the casting method. The concentrations of clove essential oil were 0% (white), 1%, 1.5% and 2% relative to the volume of solution. In the films, the antimicrobial activity was evaluated by the disc-diffusion method and mechanical analyzes (elongation and tensile strength), barrier (permeability to water vapor, water solubility and swelling index), thickness, color and characteristics morphological and structural analyzes using scanning electron microscopy (SEM). Myofibrillar proteins and gelatins extracted from gilt shavings and skin are excellent raw materials for application in biofilms, with protein content of 94.92% and 79.67% and yield of 14.10% and 32.92%, respectively. The biofilms added clove essential oil presented excellent values of water vapor permeability and high elongation values contributing to a better application in food, as well as yellow coloration with low intensity. The biofilms of myofibrillar proteins had an inhibitory effect on the concentrations used against Gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Gelatin biofilms added with OEC did not inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: biofilm; gelatine; myofibrillar proteins; waste from industry.

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 DOURADA (*Brachyplatysoma roussauxii*)

A dourada pertence à ordem Siluriformes e à família Pimelodidae, e pode atingir mais de 1,5 metros de comprimento e 20 Kg e fazem grandes migrações em busca de alimentação, reprodução e criação (BARTHEM; GOULDING, 1997). A desova da dourada ocorre nos rios Solimões e Amazonas durante os meses de junho a novembro, chegando a durar 5 a 6 meses. Esses peixes nascem em rios como o Madeira, Purus, Juruá, Içá e Japurá, e descem o Amazonas até o Estuário em Belém, onde formam grandes grupos e permanecem até completar 2 anos de idade. É um peixe muito importante para a economia da Amazônia onde são comercializados toneladas por ano (PROVARZEA, 2005).

Segundo o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, em 2011 no Brasil, a produção oriunda da pesca extrativa continental foi estimada em 249.600,2 toneladas do total capturado. Deste total, o Pará foi responsável por 55.402,7 t, o que o tornou o segundo maior produtor do país, ficando atrás do estado do Amazonas, com 63.743,3 t (BRASIL, 2011).

Dentre as espécies mais capturadas, o curimatã (*Phochilodus lineatus*), a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), jaraqui (*Semaprochilodus spp*), pescada, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a dourada (*Brachyplatysoma roussauxii*), juntas representaram 44,6% da produção pesqueira continental do país. Ainda segundo o Boletim Estatístico os dados relacionados à produção continental por espécie, mostrou que em 2010, foram capturados cerca de 14.379 toneladas de dourada (BRASIL, 2011).

#### 1.2 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DO PESCADO

Considera-se resíduo todo material que não é aproveitado durante a sua produção ou consumo devido algumas limitações tecnológicas ou mercadológicas, ou seja, não apresenta valor de uso ou de mercado, ocasionando problemas ambientais quando não tratado de maneira adequada (REBOUÇAS et al., 2012).

O processamento industrial de pescado gera grande quantidade de resíduos (cabeça, vísceras, nadadeira, cauda, coluna vertebral, barbatana, escamas, restos de carne e pele), no qual parte dele pode ser direcionada para elaboração de outros produtos, como farinha para ração animal e silagem (BRUSCHI, 2001).

Os resíduos produzidos pelas indústrias de pescado apresentam composição rica em compostos orgânicos e inorgânicos, no entanto, acarretam preocupação os impactos ambientais negativos ocasionados pelo descarte irresponsável deste material (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2002; SEIBEL; SOARES, 2003).

Os resíduos podem ser separados em dois grupos, o destinado à produção animal/vegetal e o outro para alimentação humana. O primeiro grupo é composto pelos resíduos inadequados para a elaboração de produtos para o consumo humano (vísceras, escamas, esqueleto, incluindo a cabeça) sendo descartados ou utilizados na produção de farinhas, óleos, silagens e compostagens de peixes. O segundo grupo inclui materiais comestíveis submetidos a processos de obtenção empanados, formatados, embutidos, entre outros, destinado à alimentação humana. O principal resíduo utilizado para esta finalidade é a carcaça com carne obtida após filetagem, além das aparas obtidas durante a toaleta de filés (VIDOTTI, 2016).

Assim como outras partes do peixe, a pele, considerada um subproduto, é descartada durante o processamento utilizado na indústria, com a retirada de filés. A pele pode ser destinada a fábricas de curtimento ou para extração de gelatina, sendo fonte alternativa de renda. Alguns processos como a elaboração de biofilmes, utilizam colágeno presente na pele, dando um novo destino a esses biopolímeros, colaborando para redução dos danos ao meio ambiente (BORDIGNON et al., 2012).

A pele apresenta maior teor de proteínas totais que o encontrado nos músculos, entretanto menor teor de lipídeos e esses teores podem variar de acordo com a espécie (SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL; 2008; BUENO et al., 2011). Portanto, a utilização de resíduos de pescado torna-se uma alternativa tecnológica viável, atrativa, prática, lucrativa e sustentável para a elaboração de novos produtos.

### 1.3 PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Existem três tipos de proteínas no músculo no pescado, a sarcoplasmática, representadas pela mioglobina, enzimas e proteínas citoplasmáticas; estroma inclui o colágeno e a elastina, e as proteínas miofibrilares formada por miosina, actina, tropomiosina e troponina (DANGARAN et al., 2009).

Entre as estruturas que formam as proteínas miofibrilares, a actina e miosina formam as principais frações, responsáveis pela gelificação, retenção de água e emulsificação (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008). Essas proteínas foram utilizadas na elaboração de filmes biodegradáveis por vários pesquisadores (PASCHOALICK et al., 2003; SHIKU et al., 2003, 2004; ARTHARN et al., 2007; ROCHA et al., 2014). Zavareze, et al. (2012) estudaram as propriedades físicas, mecânicas e de barreira dos filmes produzidos a partir de diferentes concentrações de proteínas miofibrilares de pescado de baixo valor comercial. As proteínas miofibrilares são normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH utilizando soluções de NaCl no início do processo de extração, para dissolução das proteínas e posteriores etapas de lavagens (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL; 2000).

As propriedades físicas das proteínas miofibrilares favoreceram a produção de biofilmes, pela capacidade de formar matrizes contínuas e coesas. Desse modo, as proteínas são mais versáteis que os polissacarídeos, por apresentarem até 20 monômeros diferentes (aminoácidos) em sua estrutura, com alto potencial de interações intermoleculares, funcionalidade essencial para formação do biofilme (OU et al., 2014; ROCHA et al., 2014).

### 1.4 COLÁGENO E GELATINA

O colágeno é um biopolímero encontrado na pele do peixe usualmente utilizado na indústria farmacêutica, cosméticos e embalagens, com aplicações médicas e biotecnológicas. Quando a pele entra em contato com água fervente o colágeno é convertido em gelatina solúvel, formando soluções coloidais e gelatinizando. A solubilização térmica do colágeno acontece após a quebra de ligações intra e intermoleculares, assim como as ligações amida nas cadeias elementares de colágeno. Assim, o peso molecular da gelatina fica mais baixo que o colágeno nativo

(KOLODZIEJSKA et al., 2008), sendo que a gelatina e o colágeno são formas diferentes da mesma macromolécula.

Existem razões que fazem com que se utilize o colágeno extraído da pele de peixe, e não de suínos e bovinos, a primeira é a evidente possibilidade de transmissão de doenças infecciosas, e a segunda é devido algumas culturas rejeitarem produtos de origem bovina e suína por suas crenças religiosas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007).

As aplicações da gelatina em microencapsulação de óleos de peixe, produção de biofilmes, entre outros, dependem das características reológicas (elasticidade e plasticidade) e físico-químicas da gelatina. Essas peculiaridades das gelatinas são influenciadas principalmente pela origem da matéria prima utilizada, temperatura da água ou do ambiente do animal (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004).

Alguns trabalhos utilizam o colágeno como forma de reaproveitar essa macromolécula, elaborando biofilmes com boas qualidades tecnológicas (WOLF, 2007; D'AVILA, 2010; SILVEIRA JUNIOR; ALFARO, 2012; NUR, et al., 2014). Ribeiro et al., (2015) que avaliou as propriedades físico-químicas e a permeabilidade ao vapor d'água de biofilmes à base de gelatina usando glicerol como plastificante; e Barreto et al. (2014) que estudou o efeito da adição de misturas de carboxilatos na permeabilidade ao vapor d'água e transparência de biofilmes de gelatina.

## 1.5 EXTRAÇÃO DE GELATINA

Os processos de extração variam dependendo da espécie do peixe ou da utilização do produto. Na extração utiliza-se tratamento alcalino e/ou ácido, seguido da aplicação de água aquecida (banho-maria). A gelatina é um ingrediente interessante para indústria, pois apresenta ponto de fusão e geleificação abaixo de 35 °C (WANG, YANG, REGENSTEIN, 2008). A gelatina pode variar seu ponto isoelétrico de acordo com a forma de obtenção, quando está entre 4,5 a 5,3 as gelatinas são tipo B (pré-tratamento alcalino) e entre 7 a 9,4 a gelatina é tipo A (pré-tratamento ácido) (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

O ácido acético é muito utilizado no processo de extração mista, alguns autores relatam que seu uso é viável, visto que o ácido é consumido na dieta humana, portanto não apresenta riscos à saúde (AHMAD, BENJAKUL, 2011; BUENO et al., 2011; LUI et al., 2012; NIU et al., 2013; ALFARO et al., 2013). No tratamento básico utiliza-se o hidróxido

de sódio, por apresentar vantagens em seu uso como baixo custo, fácil manuseio e hidrólise eficaz (AHMAD, BENJAKUL, 2011; ALFARO et al., 2013; NIU et al., 2013).

## 1.6 PLASTIFICANTE

Para melhorar a flexibilidade e extensibilidade dos biofilmes incorporam-se aditivos, que atuam como plastificantes, tornando os mais elásticos devido à diminuição de forças intermoleculares que se estabelecem entre as cadeias, proporcionando a esses materiais, uma significativa melhora em suas propriedades. Esses plastificantes devem ser compatíveis com o biopolímero e adicionados em proporções adequadas nas formulações (MALI et. al, 2006; GODBILLOT et. al., 2006; ALVES et. al., 2007; SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Os plastificantes usados em embalagens podem ser mono, di ou oligossacarídeos (SOBRAL et al., 2005), apresentam baixo peso molecular e são adicionados aos biofilmes a fim de diminuir a fragilidade e aumentar a flexibilidade e extensibilidade do material (SOBRAL et al., 2001). Na seleção do plastificante, verifica-se a compatibilidade com a matéria prima, a eficiência na aplicabilidade e a concentração na composição dos filmes, pois o aumento da quantidade de plastificante diminui a força de tensão e aumenta o alongamento do biofilme (CHOI; HAN, 2001).

Geralmente os plastificantes são adicionados na proporção de 10 a 60 g/100 g de matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (GONTARD et al., 1993), e/ou quando utilizados em pequenas quantidades, produzem o efeito denominado anti-plastificante (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005) que ao invés de aumentar a flexibilidade e hidrofiliabilidade, podem causar efeito contrário (GAUDIN et al., 1999). Geralmente, isto ocorre quando são empregadas pequenas concentrações de plastificante (abaixo de 20 g/100 g de matéria seca), assim o plastificante interage com a matriz polimérica, mas não aumentam a mobilidade molecular, pois está em quantidade insuficiente, esse fenômeno também dependente das condições de armazenamento do filme (LOURDIN et al., 1997).

## 1.7 BIOFILMES ATIVOS

Os biofilmes ativos são embalagens que alteram as condições do alimento que está sendo embalado. Entre suas funções ativas estão absorção de oxigênio, etileno, umidade, dióxido de carbono, sabores/odores ou de liberação de dióxido de carbono (KERRY; O'GRADY; HOGAN, 2006).

Além de proteger contra danos físicos, como esmagamento e impactos danosos; atribui maior durabilidade durante a estocagem e distribuição; agir como barreira a elementos externos, gases e vapor d'água; retardar a migração de umidade e o transporte de solutos; reter compostos aromáticos; manter a qualidade e/ou as características sensoriais dos alimentos; evitar ou reduzir a contaminação microbiológica durante armazenamento prolongado; e, serve como um veículo para incorporação de aditivos alimentares, como corantes, aromatizantes, antioxidantes, antimicrobianos (antibacteriana ou antifúngica), etc. (COMA, 2002; PALMU et al., 2002; FAMÁ, et al., 2005; HENRIQUE et al., 2008).

Embalagens ativas não apenas separa o alimento do meio ambiente, mas interage com o alimento para manter suas propriedades. Embalagem ativa é um conceito inovador que combina avanços em tecnologia de alimentos, segurança dos alimentos, embalagens e materiais para atender às demandas de consumidores por alimentos mais frescos e seguros (ROONEY, 1995; SCANNEL, 2000).

O uso de biofilmes em alimentos ocorre desde os séculos XII e XIII. Na China, o recobrimento de laranjas e limões com ceras já era usado para retardar a perda de umidade (DONHOWE; FENNEMA, 1994). Enquanto que o procedimento usando gelatina foi desenvolvido no início do século XIX. Funcionando como embalagem, os biofilmes podem ser elaborados com biopolímeros que oferecem vantagens na conservação de carnes frescas e processadas, como comestibilidade, biocompatibilidade, aparência estética e propriedades de barreira (HAN, 2002).

Muitos trabalhos são publicados com o intuito de contribuir para o maior conhecimento no uso de biopolímeros em biofilmes (AVENA-BUSTILLOS, et al., 2006; CARVALHO, et al., 2008; JONGJAREONRAK, et al., 2006a, 2006b; MUYONGA, et al., 2004; PÉREZ-MATEOS, et al., 2009; THOMAZINE, et al., 2005), de maneira a aproveitar seu caráter renovável e biodegradável.



A aplicação de materiais orgânicos (biopolímeros) é vantajosa, pois são oriundos de fontes renováveis, apresenta grande disponibilidade, menor custo e consumo energético, além de aumentam a resistência mecânica e a elongação dos biofilmes (ANGLÈS et al., 1999). O uso de biomateriais na elaboração de embalagens depende das suas características físicas e das propriedades dos biofilmes obtidos, que são resultados da relação entre as características físico-químicas da macromolécula e da formulação utilizada (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). Quando esses biofilmes são acrescidos de compostos que interagem com os alimentos, eles serão denominados de biofilmes ativos.

As características sensoriais como a cor, textura e sabor do alimento devem ser preservados, sem a adição excessiva de conservantes, elas podem ser alteradas através de compostos resultantes do crescimento e proliferação de micro-organismos. Alguns métodos de conservação eficazes (secagem, frio, calor) usados em alimentos, são aplicados para evitar essas reações indesejáveis. Um desses métodos é a incorporação de embalagens como aditivo antimicrobiano (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; SOARES et al., 2009).

O desenvolvimento de embalagens com atividades antimicrobianas baseia-se no fato de que, na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial, portanto um maior contato entre o produto e o agente antimicrobiano é importante (MORAES, 2007).

Alguns fatores podem afetar a ação da embalagem com antimicrobiano, como a solubilidade e tamanho da molécula do antimicrobiano, incompatibilidade com as características do alimento embalado, condições de estocagem, método de preparo do filme (extrusão ou *casting*) e a interação entre o antimicrobiano e o polímero utilizado (SOARES et al., 2009).

Trabalhos são publicados sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patogênicos e deteriorantes de origem alimentar, contribuindo para pesquisas sobre incorporação dos óleos essenciais em películas comestíveis, melhorando a segurança alimentar e aumentando a vida comercial dos produtos (OUSSALAH et al., 2004; GÓMEZ-GUILLÉN, et al., 2007; EMIROGLU et al., 2010; GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; DU et al., 2011; IGARASHI, 2015).

Gómez-Estaca et al. (2009), utilizaram gelatina da pele de atum e de boi para confecção de biofilmes e adicionaram óleos essenciais de orégano e alecrim, com o objetivo de evidenciar como a gelatina pode afetar na interação com os polifenóis nos extratos adicionados e conseqüentemente, as propriedades das películas resultantes.

Melo (2010) avaliou o efeito do filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada, avaliando seu efeito *in vitro* sobre o crescimento de mesófilos e a contagem de psicotróficos e coliformes totais e caracterização física e química de peitos de frango.

## 1.8 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS

Há milhares de anos, as especiarias e seus derivados são usados no preparo de alimentos atribuindo sabor e aroma, foram utilizados, também, foram empregadas no processo de embalsamamento, no Egito antigo, com fins medicinais, e utilizados para melhorar os aspectos sensoriais de carnes durante seu armazenamento (BEDIN; GUTKOSKI; WIEST, 1999). As especiarias atribuem estabilidade frente à ação de micro-organismos, quando inseridas em alimentos (LIMA, 2002).

A atividade microbiana dos óleos essenciais é evidente, mas o mecanismo de funcionamento não é completamente elucidado (FISHER; PHILLIPS, 2008). Na composição dos óleos essenciais há compostos que tem maior ação antimicrobiana, sendo que em quantidades adequadas podem apresentar essa funcionalidade sobre bactérias mais resistentes. Alguns extratos naturais como o de alho, canela, curry, mostarda, manjeriço, gengibre e outras ervas exibem propriedades antimicrobianas (KYUNG et. al., 2002; BENKEBLIA, 2004; PACKER; LUZ, 2007).

Tem sido constatado que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais é mais efetiva contra bactérias gram-positivas (GILL et al., 2002). As gram-negativas são relativamente resistentes a combinações de antibióticos e drogas tóxicas (KALEMBA; KUNICKA, 2003; BAGAMBOULA et al., 2004), entre elas, as do gênero *Pseudomonas sp.* são as que apresentam maior resistência aos antimicrobianos (CAREAGA et al., 2003).

Os óleos essenciais apresentam duas características importantes como agente antimicrobiano, com sua origem natural atribui mais segurança ao consumidor e ao meio ambiente e apresenta estimativa de baixo risco de desenvolvimento a resistência microbiana, pois os óleos essenciais têm em sua composição diversos agentes antimicrobianos, o que dificulta a adaptação dos micro-organismos a sua ação (DAFERERA et al., 2003; BURT, 2004; SOUZA et al., 2007).

### 2.8.1 Propriedades antimicrobianas do óleo essencial de cravo

O óleo de cravo (*Eugenia caryophyllata*) é obtido por destilação das flores, hastes e folhas do pinheiro, o cravo-da-índia é uma planta que pode ser utilizada como anestesia para peixes durante o transporte ou para minimizar o estresse antes do abate (ROUBACH et al., 2005). Pode também ser usado como agente fungicida no combate de doenças no cultivo da banana, como alternativa em seu tratamento pós-colheita (RANASINGHE et al., 2002), como antioxidante natural que reduz a atividade da peroxidase em vegetais folhosos (PONCE et al., 2003) além de ser muito utilizado na culinária.

Nascimento et al. (2000) relataram o alto potencial antimicrobiano e atividade bactericida frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* testados com o extrato de cravo-da-índia. Na literatura encontram-se algumas características atribuídas as atividades biológicas do óleo de cravo-da-índia, tais como antimicrobiana (NUNEZ et al., 2001; VELLUTI et al., 2004; VIUDA-MARTOS et al., 2007), antioxidante (JIROVETZ et al., 2007; YANISHLIEVA et al., 2006) e anestésica (SEOL et al., 2007).

Na composição volátil do óleo essencial de cravo-da-índia, três compostos foram considerados majoritários, destacando-se o eugenol, com 83,75% da área total, seguido pelo  $\beta$ -cariofileno, com 10,98%, e com 1,26%, o  $\alpha$ -humuleno e os demais compostos foram detectados em pequenas quantidades (SCHERER et al., 2009). O eugenol, principal constituinte químico do óleo essencial de cravo exibe comprovadas atividades como antimicrobiano, antiinflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Mytle et al. (2006) relataram que a aplicação de óleo de cravo na proporção de 1 e 2% reduziu a contagem de *Listeria monocytogenes* em salsicha alemã. Gómez-Estaca et al. (2010) estudaram películas biodegradáveis de gelatina e adicionada de quitosana incorporadas com óleos essenciais como agentes antimicrobianos para conservação de peixe, os filmes contendo óleo essencial de cravo inibiram todos os micro-organismos testados independentemente da matriz do filme ou tipo de micro-organismo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V.D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMAN, M. V. E. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. **Journal of Food Engineering**, v.78, 941-946, 2007.

AHMAD, M.; BENJAKUL, S. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacked (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. **Food Hydrocolloids**, v.25, n. 3, p.381-388, 2011.

ALFARO, A. DA T.; FONSECA, G. G.; BALBINOT, E.; PRENTICE, C. Characterization of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin: microbiological, rheological and structural properties. **Food Science and Technology International**. 2013.

ANGLÈS, M. N.; SALVADÖ, J.; DUFRESNE, A. Steam-exploded residual softwood-filled polypropylene composite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 74, p. 1962-1977, 1999.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlim, v.3, n.2, p.113-126, 2002.

ARTHARN, A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; TANAKA, M. Properties of a protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) as affected by muscle types and washing. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 3, p. 867-874, 2007.

ARORA, D.S.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v.12, p.257-262, 1999.

AVENA-BUSTILLOS, R. J., OLSEN, C. W., OLSON, D. A., CHIOU, B., YEE, E., BECHTEL, P. J., MCHUGH, T. H. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. **Journal of Food Science**, v. 71, p.202–207. 2006.

BAGANBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLI, G.V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *S. multicaulis* (Vahl.). **Food Chemistry**, v. 84, n.4, p. 519-525, 2004.

BARRETO, A. R. M.; LEITE, R. H. L.; AROUCHA, E. M. M.; SANTOS, F. K. G.; OLIVEIRA, T. A. Efeito da adição de misturas de carboxilatos na permeabilidade ao vapor d'água e transparência de filmes de gelatina. Universidade Federal Rural do Semiárido. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis. 2014.

BARTHEM, R. B.; GOULDING, M. Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes. Tefé-AM: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq. 140 pp. 1997.

BEDIN, C.; GUTKOSKI, S. B.; WIEST, J. M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 65, p. 26-29, 1999.

BENKEBLIA N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm Wiss Technology**, 37:263–8. 2004.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura**. Brasília: 2011.

BRUSCHI, F. L. F. Rendimento, composição química e perfil de ácidos graxos de pescado e seus resíduos: uma comparação. Monografia (Centro de Ciências Tecnológicas, da Terra e do Mar, Oceanografia) Universidade do Vale do Itajaí. 65 f, 2001.

BORDIGNON, A. C.; FRANCO, M. L. R. DE S.; GASPARINO, E.; YAJIMA, E. M.; VESCO, A. P. DEL; VISENTAINER, J. V., MIKCHA, J. M. G. Aproveitamento de peles de tilápia-do-nylo congeladas e salgadas para extração de gelatina em processo batelada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p 473-478, 2012.

BUENO, C. M.; ALVIM, I. D.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; PORTELLA, M. C.; GROSSO, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Tecnology**, v.14, n.01, p.65-73, 17 mar. 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Holanda, v. 94, n. 3, p. 223-253. 2004.

CAREAGA, M.; FERNÁNDEZ, E.; DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO M. E.; HERNANDEZ-SANCHEZ, H. Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n.3, p. 331-335, 2003.

CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; THOMAZINE, M.; HABITANTE, A. M. Q. B.; GIMENEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1117–1123. 2008.

CHOI, WON-SEOK; HAN, JUNG H.; Physical and Mechanical Properties of Pea-Protein-based Edible Films. JFS: **Food Engineering and Physical Properties**. 66. 2001.

COMA, V.; MARTIAL GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. **Journal of Food Science**, vol. 67, n. 3, p. 1162-1169, 2002.

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

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v.22, p. 39-44, 2003.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and function of protein-based edible films and coatings. Em: **Edible Films and Coatings for Food Applications**. p. 25-26. New York: ed. Springer, 2009.

D'AVILA, V. D. L. Biofilmes à base de gelatina, aplicados na conservação de frutos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis/SC. 2010.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROSCARRIEDO, M. (Eds.). *Edible Films and Coatings to Improve Quality*. Lancaster: **Technomic Publishing Co.**; p.1-24, 1994.

DU, W. X.; OLSEN, C. W.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MCHUGH, T. H.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. **Journal Food Science**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 390-397. 2009.

EMIROĞLU, Z.K.; YEMIŞ, G.P.; COŞKUN, B.K.; CANDOĞAN, 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.

FAMÁ, LUCÍA; ROJAS, ANA M.; GOYANES, SILVIA; GERSCHENSON, LÍA. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. **LWT -Food Science and Technology**. v.38. 631–639. 2005.

FISHER, K.; PHILIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trend in Food Science & Technology**, v.19, n.3, p.156-164, 2008.

GAUDIN, S.; LOURDIN, D.; LE BOTLAN, D.; ILARI, J. L. Colonna P. Plasticisation and mobility in starch-sorbitol films. **Journal of Cereal Science, London**, v.29, p.273-284, 1999.

GILL, A.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal Food Microbiology**, v73, p. 83-92, 2002.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. 30: 374-381. 2007.

GODBILLOT, L.; DOLE, P.; JOLY, C.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Analysis of water binding in starch plasticized films. **Food Chemistry**, v. 96, p. 380-386, 2006.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; TURNAY, J.; FERNÁNDEZ-DÍAS, M.D. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v.16, n.1, p.25-34, 2002.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTEIRO, P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, v. 21, n.7, p.1133-1143, out. 2007.

GÓMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; ALEMÁN, A.; GÓMEZ-GUILLÉN M. C. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. Instituto del Frío (CSIC), Madrid, Spain. 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ DE LACEY, A.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatin chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, vol.27, p. 889-896, 2010.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, vol. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.

HAN, J. H. Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. In: Gennadios, A. Protein-based Films and Coatings. Boca Raton: Flórida, **CRC Press**, p. 485 – 499, 2002.

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**. 28. 231-240. 2008.

HENRY-SILVA, G. G. H.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 519-526, 2002.

IGARASHI, M. C. Incorporação de antimicrobianos naturais em filme biodegradável à base de alginato para o controle de *Listeria monocytogenes* em embutido cárneo fatiado. Tese. Universidade de São Paulo. 2015.

JIROVETZ, L. et al. Purity, antimicrobial activities and olfactic evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, n.3, p.288-91, 2007.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Characterization of edible films from skin gelatin of browstripe red snapper and bigeye snapper. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 492–501. 2006a.

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. 2006b.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Proprieties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.10, p.813-829, 2003.

KERRY, J. P.; O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potencial utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: a review. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p. 113-130, 2006.

KOŁODZIEJSKA, I.; SKIERKA, E.; SADOWSKA, M.; KOŁODZIEJSKI, M.; NIECIKOWSKA, C. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. **Food Chemistry**, v.107, n.2, p.700-706, mar. 2008.

KYUNG, K. H.; KIM, M. H.; PARK, M. S.; KIM, Y. E. Alliinase independent inhibition of *Staphylococcus aureus* B33 by heated garlic. **Journal of Food Science**, 67, 780–785. 2002.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, p. 482-501. 2002.

LIU, Z.; XIAOJUN, G. E.; YUAN, L. U.; SHIYUAN, D.; YUANHUI, Z.; MINGYONG, Z. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n.1, p. 311-317, jan. 2012.

LOURDIN, D.; COIGNARD, L.; BIZOT, H.; COLONNA, P. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. **Polymer: The Chemistry, Physics And Technology Of High Polymer**, London, v.38, n.21, p. 5401-5406, Oct. 1997.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, 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**, v. 75, n. 04, p. 453-460. 2006.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1017-1023, 1999.

MELO, A. A. M. Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriado. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. 2010.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisas Agropecuárias do Brasil**, v. 35, n. 1, p. 179-189, 2000.



MORAES, A. R. F.; GOUVEIA, L. E. R.; SOARES, N. de F. F.; SANTOS, M. M. de S.; GONÇALVES, M. P. J. C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. Universidade Federal de Viçosa – UFV, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 27(supl.): 33-36, 2007.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 581–592. 2004.

MYTLE, N. ANDERSON, G.L.; DOYLE, M. P.; SMITH, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v.17, n.2, p.102-7, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C., SILVA, G.L. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology** 31: 247-256. 2000.

NIU, L.; ZHOU, X.; YUAN, C.; BAI, Y.; LAI, K.; YANG, F.; HUANG, F. Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 336-341, dez. 2013.

NUNEZ, L. et al. Antifungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.2, p.123-6, 2001.

NUR, Z. A.; HANANIA, Y. H.; ROOS, J. P. KERRY. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 94–102, n.71. 2014.

OLIVEIRA J. R., A. R. **Obtenção e caracterização de acetato de celulose modificado com organossilano**. Dissertação (Mestrado em Química\_Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas) Campinas, 2002.

OU, S.; WANG, Y.; TANG, S.; HUANG, C.; JACKSON, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. **Journal of Food Engineer**, v.70, p.205-210, 2014.

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

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(1): 102-107, Jan./Mar. 2007.

PALMU, P. T.; GROSSO, C. R. F.; FAKHOURI, F. M.. Filmes biodegradáveis. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 26- 2002.

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

PÉREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. **Food Hydrocolloids**. v. 23, n, 1, 53-61. 2009.

PONCE, A.G., VALLE, C.E., ROURA, S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss Chard. **Lebensm Wiss Technology** 37: 679-784. 2003.

PROVARZEA. Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea. **A vida da PiraMutaba e da Dourada**. Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Varzea/Ibama, Brasília: Ibama, 2005.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Conformational and rheological changes in catfish myosin during alkali- induced unfolding and refolding. **Food Chemistry**. v. 107, p. 385-398, 2008.

RANASINGHE, L., JAYAWARDENA, B., ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. pathogens isolated from banana. **Lett Appl Microbiology** 35: 208-211. 2002.

REBOUÇAS, M. C.; RODRIGUES, M. C. P.; CASTRO, R. J. S.; VIEIRA, J. M. M. Caracterização do concentrado protéico de peixe obtido a partir dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 697-704, 2012.

RIBEIRO, P. B.; ALVES, R. C.; RICARDO, L. P.; MORAIS, M. M.; ROSA, G. S. Avaliação das propriedades físico-químicas e da permeabilidade ao vapor d'água de biofilmes à base de gelatina usando glicerol como plastificante. Universidade Federal do Pampa. ENEMP- Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados 2015, São Carlos – SP. 2015.

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 Engineer**, v.116, p.666-673, 2014.

ROONEY, M. L. Active packaging in polymer films. In: ROONEY, M. L. Active food packaging. **Glasgow: Chapman & Hall**, p. 74-110. 1995.

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, n.11, p.1056-61, 2005.

SCANNELL, A. G. M; HILL, C.; ROSS, R. P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E. K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2-3, p. 241-249, 2000.

SHIKU, Y.; HAMAGUCHI, P.Y.; TANAKA, M. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. **Fish Science**. v. 69, p. 1026-1032, 2003.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 01, p. 79-88. 2007.

SILVEIRA JUNIOR, J. F. dos; ALFARO, A. da T. Caracterização óptica e solubilidade de biofilme produzido a partir de gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnologia. UTFPR. 2012.

SEIBEL, N. F.; SOARES, L. A. S. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SEOL, D.W. et al. Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). **Aquaculture Research**, v.38, n.1, p.45-9, 2007.

SOARES, N. de F.F.; SILVA, W. A. da; PIRES, A.C. dos S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v.56, n. 4, p. 370-378, 2009.

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

SOBRAL, P. J. A.; QUINTERO, E. S. M.; HABITANTE, A. M. Q. B.; GARCÍA, S. R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. **Innovations in Food Packaging**. v. 23. p. 403-33. 2005.

SONGCHOTIKUNPAN, P.; TATTIYAKUL. J.; SUPAPHOL, P. Extraction and electro spinning of gelatin from fish skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.42, n.3, p. 247-255. 2008.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. **Innovations in Food Packaging**. Academic Press. 403-433 p., 2005.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. I. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 172-176. 2005.

VELLUTI, A. et al. Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B-1 production by *Fusarium verticilloides* in maize. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.84, n.10, p.1141-6, 2004.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S. Tecnologias para o aproveitamento integral de peixes. Endereço: [http://www.cpaafap.embrapa.br/aquicultura/wpcontent/uploads/2011/10/apresentacao\\_rosevidotti\\_tecnologias-para-o-aproveitamento-integral-depeixes.pdf](http://www.cpaafap.embrapa.br/aquicultura/wpcontent/uploads/2011/10/apresentacao_rosevidotti_tecnologias-para-o-aproveitamento-integral-depeixes.pdf). Acesso em: 30/05/2016.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. **Journal of Food Safety**, v.27, n.1, p.91-101, 2007.

WANG, Y; YANG, H.; REGENSTEIN, J. M. Characterization of Gelatin at Nanoscale Using Atomic Force Microscopy. **Food Biophysisc**, v.3, n.2, p.269-272,9 abr. 2008.

WOLF, K. L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, São Paulo. 2007.

YANISHLIEVA, N.V. et al. Natural antioxidants from herbs and species. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, n.9, p.776-93, 2006.

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

## CAPÍTULO II

### Artigo

#### PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS E ANTIMICROBIANA DE BIOFILMES DE PROTEÍNAS DE PEIXE COM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antimicrobiana de biofilmes elaborados com proteínas de resíduos de filetagem de dourada (*Brachyplatysoma roussauxii*) com óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*), e analisar as propriedades tecnológicas dos filmes. Foram elaborados dois biofilmes, com 2% de proteínas miofibrilares extraídas de aparas de filetagem e outro com 2% de gelatina da pele de dourada, pelo método de *casting*. As concentrações de óleo essencial de cravo foram de 0%, 1%, 1,5% e 2% em relação ao volume de solução. Foi avaliada a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão e também feitas análises mecânicas, de barreira, espessura, cor e características morfológicas e estruturais por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os biofilmes com óleo essencial de cravo apresentaram excelentes valores de permeabilidade a vapor d'água e de alongação contribuindo para melhor aplicação em alimentos, assim como apresentou coloração amarela clara. Os biofilmes de proteínas miofibrilares apresentaram efeito inibitório frente às bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus fecalis*. Os biofilmes de gelatina com OEC não inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras-chave: embalagem ativa, resíduos indústria, micro-organismos

Technological and antimicrobial properties of fish protein biofilms with clove essential oil

**ABSTRACT:** The aim of this work was to evaluate the antimicrobial capacity of biofilms, made with protein obtained from filleting residues of dourada (*Brachyplatysoma roussauxii*) added of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*), and to analyze the technological properties. Two biofilms were elaborated, one with 2% myofibrillar proteins extracted from filleting shavings and the other one with 2% dourada skin gelatin, by the casting method. The clove essential oil concentrations were 0%, 1%, 1.5% and 2% in relation to the volume of the solution. The antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion method and mechanical analyses as barrier, thickness, color and morphological and structure characteristics by the Scanning Electron Microscopy (SEM) were performed. The biofilms added of clove essential oil presented excellent values of water vapor permeability and high values of elongation, contributing for the better application in foods, as well as they presented yellow color with low intensity. The biofilms with myofibrillar proteins presented inhibitory effect in the concentrations used against the Gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus fecalis*. The gelatin biofilms added of clove essential oil did not inhibit the growth of Gram positive and Gram negative bacteria.

Key words: active packaging; industry residues, microorganisms

## INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de pescado produz resíduos orgânicos e inorgânicos que podem ser aproveitados a fim de reduzir os impactos ambientais, ameaças à saúde pública, gerando empregos e acelerando o crescimento econômico. Estes resíduos (aparas de filetagem e peles) podem ser transformados em novos produtos pela indústria aumentando a renda e criando novos empregos. As aparas e peles contêm alto teor de proteínas, miofibrilares e colágeno, que possuem habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, boa barreira ao oxigênio podendo ser utilizados na elaboração de filmes biodegradáveis (Cortez-Vega et al., 2013).

Os biofilmes também podem proteger o produto embalado de danos físicos, como esmagamentos e rupturas, e/ou biológicos, contaminações por micro-organismos, aumentando a validade do alimento, sendo importante na estocagem e comercialização. As propriedades mecânicas dos biofilmes podem ser melhoradas quando incorporado aditivos plastificantes, tornando-os mais elásticos, sendo compatíveis com os biopolímeros (Zavareze et al., 2014).

As embalagens ativas são assim denominadas quando incorporadas de agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes para melhorar a performance dos biofilmes. Entre estes agentes estão os óleos essenciais que possuem compostos com grande ação antimicrobiana, podendo agir em quantidades adequadas sobre bactérias resistentes (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Pesquisas realizadas relacionam os óleos essenciais com atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes relacionados a alimentos e as embalagens ativas não somente protegem, mas também podem interagir com o produto embalado (Gómez-Estaca et al., 2010).

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) apresenta como principal constituinte químico o eugenol, além de outros compostos fenólicos de forma minoritária,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, que exibem comprovada atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Os agentes antimicrobianos presentes nos óleos essenciais são liberados lentamente na superfície do alimento, permanecendo em altas concentrações por muito tempo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades tecnológicas dos filmes e a capacidade antimicrobiana do óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*) aplicado

aos biofilmes de proteínas miofibrilares e de gelatina retiradas de resíduos da filetagem de dourada (*Brachyplatysoma roussauxii*).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados resíduos (peles e aparas) oriundos do processo de filetagem de dourada (*Brachyplatysoma roussauxii*), obtidas no Mercado Municipal Ver-o-Peso, Belém, Pará. O óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*) com concentração de 85,74% do eugenol foi adquirido da empresa Quinari<sup>®</sup> Fragrâncias e Cosméticos Ltda.

### **Obtenção das proteínas miofibrilares**

Para a obtenção das proteínas miofibrilares da dourada utilizou-se metodologia proposta por Limpan et al. (2010). A massa muscular foi misturada com três volumes de água destilada a 5°C e centrifugada a 10.000 rpm durante 2 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (Thermo Fisher, Multifuge X1R) e em seguida foi filtrada em camada de tecido de faillet. O material retido foi misturado com 5 volumes de solução de cloreto de sódio 50 mM (Synth PA-ACS) a 5°C por 5 minutos e submetido a filtração, este processo foi repetido mais duas vezes. Após estas etapas, as proteínas miofibrilares foram distribuídas em bandejas de aço inoxidável, congelada a -22°C e liofilizadas a -60°C por 48 horas (Liotop, L101). Posteriormente, as proteínas miofibrilares liofilizadas (PML) foram peneiradas em Tyler 35 (abertura 0,42 mm) e mantidas sob congelamento, até a utilização. O rendimento foi calculado pela razão entre a massa final e a massa inicial de proteínas multiplicado por 100.

Para a extração da gelatina das peles da dourada foi utilizando o método descrito por Bueno et al. (2011) com adaptações. As peles foram cortadas e colocadas em solução de cloreto de sódio 0,6M (1/5 p/p) à 25±1°C e agitadas à 85 rpm por 15 minutos em incubadora Shaker (Lucadema, Luca 223). Em seguida foi adicionada solução de NaOH 0,3M à 25±1°C, com agitação de 85 rpm por 15 minutos e posteriormente, a solução de ácido acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) 0,02M à 25±1°C à 85 rpm por 60 minutos. Após cada etapa de pré-tratamento com as soluções as peles foram lavadas três vezes em água corrente e depois foi adicionada água destilada na proporção 1/5 (peso pele/peso solução) e aquecida em banho-maria (Modelo TE – 057) a 64°C. A solução final foi filtrada (tecido faillet), o material retido foi acondicionado em bandejas de aço inox, congelada e liofilizada (Liotop, Modelo L101) à -60°C por 48 horas, pesado e armazenado em embalagens de polietileno, à

vácuo. Para o cálculo de rendimento foi realizado a razão entre o peso da gelatina seca pelo peso úmido de pele fresca multiplicado por 100.

### **Elaboração dos biofilmes de proteínas miofibrilares**

Os biofilmes de proteínas miofibrilares foram elaborados de acordo com Limpan et al. (2010) com modificações, no qual o preparo da solução filmogênica consistiu na suspensão de 2% proteínas em água destilada (p/v). O pH da solução foi ajustado a 11, com hidróxido de sódio 2M (Cinética, NaOH-PA) e adicionado 15% de plastificante (Isotar, Glicerina PA com 99,5% de pureza). A solução final foi homogeneizada (Turratec -Tecnal, TE-102) a 10.000 rpm durante 5 minutos e aquecida a 70°C em banho-maria (TECNAL, TE-057) durante 30 minutos. Posteriormente, a solução foi resfriada para incorporar o óleo essencial de cravo (OEC) nas concentrações de 1%, 1,5%, e 2% em relação à massa total da solução filmogênica (Mattei et al., 2013) e o surfactante Lauril Sulfato de Sódio (SDS), 70% em relação à massa de óleo (Davanço et al., 2007). Foi elaborado biofilme sem o óleo para ser utilizado como branco.

### **Elaboração dos biofilmes de gelatina**

Os biofilmes de gelatina foram elaborados a partir da diluição de 2% de gelatina (m/v) e 15% de glicerol (em relação à massa de gelatina) em água destilada (p/v), conforme a proposto por Gómez-Estaca et al. (2010) com modificações. Em seguida, a mistura foi aquecida em banho-maria a 70 °C e homogeneizada (Turatec TE-102) por 15 minutos, formando a solução filmogênica. O óleo de cravo foi incorporado nas concentrações de 1%, 1,5%, e 2% em relação à massa total do filme (Mattei et al., 2013) e o surfactante SDS a 70% foi adicionado em relação à massa de óleo (Davanço et al., 2007). Também foi elaborado biofilme sem o óleo para ser utilizado como branco.

De acordo com o método *casting* 120 mL da solução filmogênica de proteínas miofibrilares e de gelatina obtidas foram adicionadas em suporte de silicone (22cm de diâmetro x 3cm de altura) e submetidas à secagem a 25°C por 16hs em estufa incubadora DBO (QUIMIS, Q315M). Após a secagem os biofilmes formados foram acondicionados em embalagens de polietileno e mantidos em temperatura ambiente para realização das análises.



## Propriedades dos biofilmes

A espessura dos biofilmes foi medida utilizando micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, modelo IP54) em seis locais aleatórios obedecendo um afastamento da borda de 60 mm (Limpan et al., 2010). A cor foi determinada utilizando colorímetro MINOLTA modelo CR 310, obtendo-se parâmetros de  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (intensidade do vermelho),  $b^*$  (intensidade do amarelo),  $C^*$  (valor do croma),  $h^*$  (ângulo de tonalidade) e diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) e nos valores de Croma ( $\Delta C$ ).

As propriedades mecânicas, resistência à tração (RT) e percentual de alongamento na ruptura (%E) dos biofilmes foram determinadas empregando-se metodologia ASTM D882-91 (ASTM, 1996) em texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA. XT- plus). A separação inicial das garras e a velocidade foram de 50 mm e 1 mm.s<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras foram cortadas em tiras de 100mm de comprimento e 25mm de largura (Limpan *et al* 2010) e as respostas foram calculadas pela equação 1 ( $RT = Fm/A$ ) onde: RT = resistência à tração (MPa); Fm = força máxima no momento da ruptura do filme (N); A = área da secção transversal do filme (m<sup>2</sup>) e a equação 2 ( $E = dT/d_{inicial} \times 100$ ) onde: E = alongamento (%); d<sub>T</sub> = distância total no momento da ruptura (mm); d<sub>inicial</sub> = distância inicial de separação das garras (50 mm).

Para medir a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi utilizado método modificado ASTM (American Society for Testing and Materials, 1989) descrito por Arfat et al. (2014). Os filmes foram colocados em recipiente de permeação de vidro com 4,5 cm de diâmetro e 7,0 cm de altura contendo 10g de sílica gel seca (0% UR; 0 Pa de pressão de vapor de água a 30 °C) com adesivo de silicone. Em seguida, os recipientes de permeação foram colocados em dessecadores com água destilada a 30 °C (99% de UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor a 30 °C) e pesados a cada hora durante 10 h. A PVA dos filmes foi calculada com a equação 4 ( $PVA = W.X/A.t.\Delta P$ ) onde: PVA = permeabilidade ao vapor de água (g. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>); W = ganho de peso pelo dessecante (g); X = espessura do filme (mm); A = área da superfície do biofilme exposto (m<sup>2</sup>); t = tempo de incubação (hs);  $\Delta P$  = diferença de pressão parcial (Pa). Três corpos de provas foram usados para testes de PVA.

Para determinação da solubilidade foi estabelecida a matéria seca inicial em estufa a 105 °C/24h em filmes recortados com 2cm de diâmetro. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em 50mL de água. O sistema foi agitado em incubadora Shaker refrigerada (Cielanb, modelo CE-725B) a 150 rpm por 24 horas a 25°C. Após este período,

as amostras foram removidas e secas (105°C por 24 horas), para determinar a matéria seca não dissolvida em água (Gontard et al. 1994).

Na determinação do intumescimento uma amostra de 2cm de diâmetro foi pesada e imersa em 75 mL de água destilada, e em seguida colocada em estufa incubadora (Quimis, Q315M) a 25 °C por 6 h. Após este procedimento, o excesso de água dos filmes foi removido com papel filtro e pesado novamente. O intumescimento foi determinado como o ganho de peso da amostra dividido pelo peso inicial de sólidos secos (Lee et al., 2004). A microestrutura da superfície superior e da secção transversal do biofilme foi determinada utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Leo-Zeiss, modelo 1430).

Para realizar os testes de suscetibilidade antimicrobiana por disco-difusão foram utilizados os micro-organismos patogênicos bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* INCQS 00234 (ATCC 2912) e Gram-negativas: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), e *Salmonella typhimurium* INCQS 00150 (ATCC 14028), que são frequentemente relacionadas a contaminação em alimentos (Ushimaru *et al.*, 2007; Ayala-Zavala, 2009; Santos *et al.*, 2011). As cepas foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar de acordo com metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2015). As suspensões bacterianas foram cultivadas por 18h a 36°C em caldo Mueller-Hinton (Difco). Posteriormente, uma nova inoculação foi feita nas mesmas condições, porém incubadas somente por 6h (para uso do inóculo recente). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Com um *swab* estéril, o inóculo bacteriano foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton (Difco).

Foram obtidos discos de 6 mm de diâmetro, de cada biofilme previamente esterilizados em camara UV, foram levemente pressionados contra a superfície do meio de cultivo em placas de Petri, e incubadas à 36°C por 18 horas. Para as bactérias Gram-negativas foi utilizado como controle positivo Ampicilina (10µg) e para as Gram-positivas Vancomicina (30µg). Como controles negativos foram utilizados os biofilmes sem adição de óleo de cravo. As placas foram incubadas a 36°C por 18 horas e avaliado os halos de inibição formados. Foi considerado como atividade antimicrobiana positiva quando

observada a inibição do crescimento bacteriano com diâmetro de halo  $\geq 10$  mm (Souza *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e Análise de Componentes Principais (ACP) pelo programa estatístico Statistical Analysis System (SAS), pacote PROC GLM e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises mecânicas, de espessura e de cor dos biofilmes de proteínas miofibrilares (PM) encontram-se na Tabela 1. Os biofilmes apresentaram valores elevados de alongação sem diferença entre as concentrações de óleo essencial de cravo (OEC). Segundo Zavareze *et al.* (2014) o aumento da alongação está diretamente relacionado a concentração de plastificante adicionada na solução filmogênica, além do pH alcalino que favorece a solubilização das proteínas.

Tabela 1: Resultados das análises dos biofilmes de proteínas miofibrilares (PM) com adição de óleo essencial de cravo (OEC).

Determinações	Biofilmes de Proteínas Miofibrilares			
	Formulações			
	F1	F2	F3	F4
Elongação (%)	289,34 <sup>a</sup> ± 4,40	300,38 <sup>a</sup> ± 4,20	274,78 <sup>a</sup> ± 5,00	279,20 <sup>a</sup> ± 3,70
RT (Mpa)	10,1 <sup>a</sup> ± 0,90	2,65 <sup>b</sup> ± 0,10	3,37 <sup>b</sup> ± 0,50	2,7 <sup>b</sup> ± 0,10
Espessura (mm)	0,057 <sup>c</sup> ± 0,006	0,086 <sup>b</sup> ± 0,006	0,105 <sup>a</sup> ± 0,008	0,102 <sup>a</sup> ± 0,011
PVA ( $\text{gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ )	5,8 <sup>a</sup> ± 2,61 x 10 <sup>-12</sup>	5,13 <sup>a</sup> ± 5,96 x 10 <sup>-12</sup>	4,16 <sup>a</sup> ± 1,39 x 10 <sup>-11</sup>	4,53 <sup>a</sup> ± 3,72 x 10 <sup>-12</sup>
Solubilidade (%)	45,74 <sup>d</sup> ± 0,10	52,79 <sup>b</sup> ± 1,38	65,04 <sup>a</sup> ± 0,20	50,0 <sup>c</sup> ± 0,10
Intumescimento (%)	26,38 <sup>c</sup> ± 3,73	36,65 <sup>ab</sup> ± 2,75	42,49 <sup>a</sup> ± 1,86	33,82 <sup>bc</sup> ± 3,03
	Parâmetros de Cor			
L*	89,0 <sup>a</sup> ± 0,72	83,8 <sup>b</sup> ± 1,07	79,78 <sup>c</sup> ± 0,44	78,51 <sup>c</sup> ± 0,36
a*	-5,68 <sup>d</sup> ± 0,04	-3,98 <sup>c</sup> ± 0,35	-2,61 <sup>b</sup> ± 0,09	-1,84 <sup>a</sup> ± 0,10
b*	20,9 <sup>c</sup> ± 1,60	27,6 <sup>b</sup> ± 1,48	29,5 <sup>ab</sup> ± 0,16	31,52 <sup>a</sup> ± 0,11
C	21,4 <sup>c</sup> ± 1,24	27,9 <sup>b</sup> ± 1,42	29,7 <sup>ab</sup> ± 0,24	31,58 <sup>a</sup> ± 0,12
h	105,4 <sup>a</sup> ± 1,05	98,21 <sup>b</sup> ± 1,14	95,06 <sup>c</sup> ± 0,21	93,33 <sup>c</sup> ± 0,17

RT: Resistência a Tração; PVA: Permeabilidade a Vapor de Água; Cor: L\* (Luminosidade); a\* (verde-vermelho); b\* (azul-amarelo); C (croma); h (Ângulo Hue). F1: 0%; F2: 1%; F3: 1,5%; F4: 2%.

Para garantir a integridade das embalagens é requerido valor elevado da resistência à tração (RT) nos biofilmes. A RT encontrada no biofilme F1 (controle) apresentou diferença ( $p \leq 0,05$ ) com os demais. Segundo Gontard et al. (1994) a resistência dos filmes depende da natureza do material filmogênico, da coesão da estrutura da matriz polimérica, e da concentração de proteína miofibrilar, que fornece maior quantidade de grupos sulfidrílicos na superfície da proteína, auxiliando a formação de filmes mais resistentes.

Para os valores de espessura, os biofilmes F3 e F4 diferiram ( $p \leq 0,05$ ) dos demais e a espessura influencia as propriedades tecnológicas dos biofilmes. Diversos valores de espessura para filmes biodegradáveis são relatados em pesquisas realizadas por Limpan et al. (2010); Cortez-Vega et al. (2013) e Zavareze et al. (2014).

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA) não apresentaram diferença entre os biofilmes e encontram-se próximos dos valores ( $2,77$  a  $5,34 \times 10^{-11}$  g.m.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup>) relatados por Arfat et al. (2014). As propriedades de barreira dos filmes dependem da temperatura, da umidade relativa do ambiente, da interação dos biopolímeros com os permeantes, da estrutura química e morfológica dos biopolímeros, além do espaço livre intermolecular (Matta Junior et al., 2011).

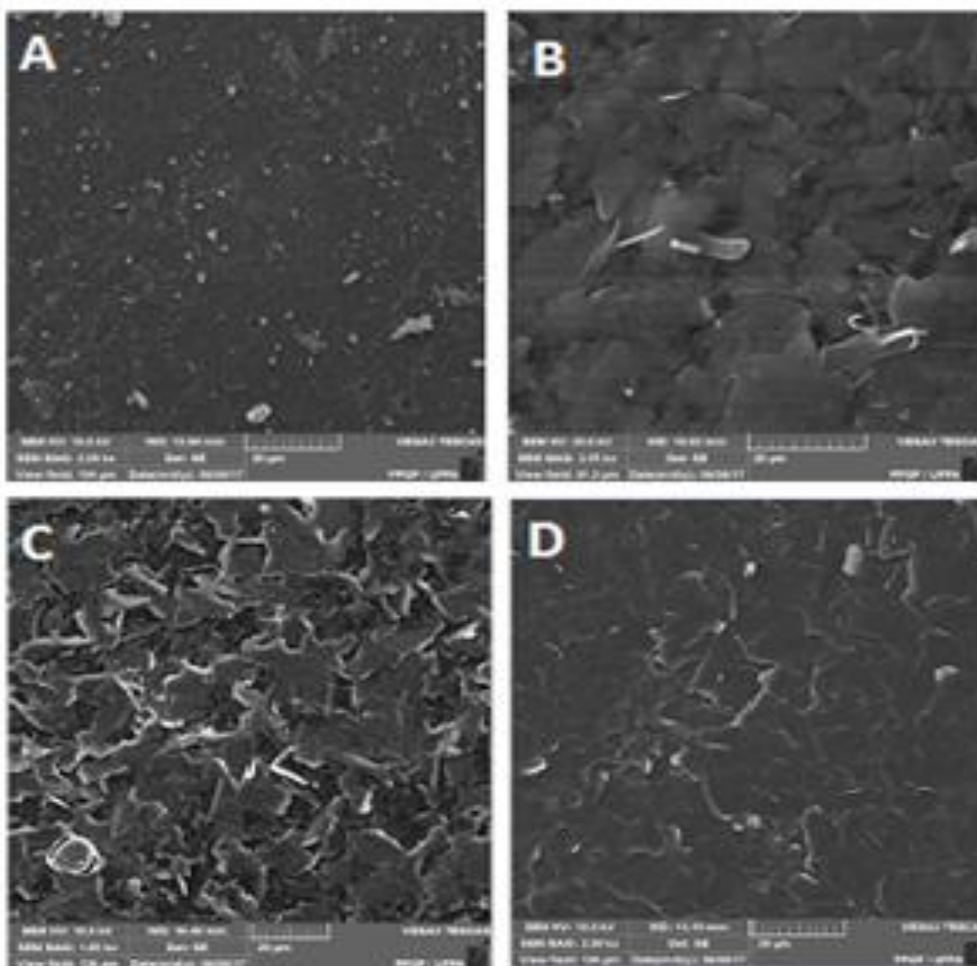
Os percentuais de solubilidade e intumescimento dos biofilmes produzidos neste trabalho diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ), com o maior valor para o biofilme F3. O grau de solubilidade do biofilme em água é uma propriedade que deve ser conhecida a fim de facilitar o direcionamento para o tipo de alimento que essa embalagem pode proteger. Algumas aplicações exigem filmes insolúveis em água para aumentar a integridade do produto (Zavareze et al., 2014). A solubilização de um polímero hidrofílico envolve a penetração ou difusão de água no seu interior com consequente intumescimento, seguido do relaxamento do polímero (Turhan & Sahbaz, 2004).

Os biofilmes apresentaram alto valor de luminosidade (Tabela 3) sem diferença significativa, com superfície clara e boa aparência. Os parâmetros de cor são importantes para definição da aparência global, consumo e aceitação de embalagens de alimentos (Akhtar et al., 2013).

Os biofilmes analisados apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) no parâmetro a\*, indicando amostras levemente esverdeadas, mas o b\* e o ângulo de tonalidade (h\*), mostram tendência a coloração amarelo claro devido a presença do óleo de cravo. Nos valores de croma (C\*) foi observada diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os biofilmes expressando

baixa saturação ou intensidade da cor. O valor do ângulo Hue (h) apresenta diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os biofilmes, sendo observado decréscimo nos valores conforme aumenta a presença de OEC na formulação, reafirmando a coloração amarelada.

As imagens da análise microscópica dos biofilmes de proteína miofibrilar (Figura 1) mostram que os componentes dos biofilmes formam uma estrutura com algumas irregularidades, mas sem apresentar bolhas ou grandes deformações, como fendas e espaços abertos. A presença de fendas e/ou irregularidades nos biofilmes pode comprometer a estrutura, produzindo modificações nas propriedades funcionais do biofilme. As imagens também revelam pontos brancos, onde pode-se inferir que sejam componentes adicionados não solubilizados durante o processo de elaboração dos biofilmes, como por exemplo, o surfactante SDS utilizado para melhor incorporação do óleo essencial.



**Figura 1:** Microfotografias da superfície dos biofilmes de proteína miofibrilar com óleo essencial de cravo, com ampliação de  $\cong 2.000$  x. A (F1); B (F2); C (F3); D (F4).

Os valores de alongação dos biofilmes de gelatina (Tabela 2) demonstram que não houve diferença ( $p \geq 0,05$ ) entre as formulações. Os resultados da RT mostram que não houve diferença entre as formulações F1 e F2, assim como entre F3 e F4, no entanto, apresentam diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre estes dois grupos observando-se que com o aumento da concentração de OEC a RT diminui. Este comportamento pode ser explicado pelo enfraquecimento das interações que estabilizam a matriz proteica quando adicionado outros componentes ao filme (Orliac *et al.*, 2002). A incorporação de lipídios em filmes com proteínas pode aumentar a tensão de ruptura, no entanto esses biofilmes geralmente apresentam propriedades mecânicas como resistência e alongação de considerável qualidade (Wolf, 2007). As características da resistência à tração e alongação estão altamente associadas à quantidade de plastificante, natureza do material filmogênico e coesão da estrutura da matriz polimérica (Wolf, 2007). Os biofilmes desta pesquisa foram elaborados com baixa quantidade de glicerol (15% em relação à massa de gelatina), fazendo que a elasticidade da gelatina seja responsável por este comportamento.

Tabela 2: Resultados das análises dos biofilmes de gelatina com adição de óleo essencial de cravo (OEC).

Determinações	Biofilmes de Gelatina			
	Formulações			
	F1	F2	F3	F4
Elongação (%)	434,87 <sup>a</sup> ± 3,04	443,46 <sup>a</sup> ± 1,86	451,44 <sup>a</sup> ± 0,13	447,97 <sup>a</sup> ± 0,52
RT (Mpa)	6,54 <sup>a</sup> ± 1,70	7,70 <sup>a</sup> ± 1,80	2,61 <sup>b</sup> ± 0,23	3,12 <sup>b</sup> ± 0,90
Espessura (mm)	0,100 <sup>a</sup> ± 0,01	0,124 <sup>a</sup> ± 0,03	0,118 <sup>a</sup> ± 0,03	0,134 <sup>a</sup> ± 0,01
PVA (gm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> )	6,52 <sup>a</sup> ± 6,51x10 <sup>-12</sup>	5,90 <sup>a</sup> ± 1,79 x10 <sup>-11</sup>	4,81 <sup>a</sup> ± 9,22 x10 <sup>-12</sup>	1,02 <sup>a</sup> ± 3,46 x10 <sup>-12</sup>
Solubilidade (%)	59,85 <sup>b</sup> ± 2,06	42,17 <sup>c</sup> ± 4,20	65,04 <sup>a</sup> ± 3,33	50,08 <sup>b</sup> ± 2,32
	Parâmetros de Cor			
L*	93,1 <sup>a</sup> ± 0,53	90,3 <sup>b</sup> ± 0,61	92,04 <sup>a</sup> ± 0,47	89,34 <sup>b</sup> ± 0,42
a*	-5,5 <sup>b</sup> ± 0,02	-5,27 <sup>a</sup> ± 0,06	-5,9 <sup>c</sup> ± 0,08	-6,0 <sup>c</sup> ± 0,05
b*	11,78 <sup>c</sup> ± 0,66	17,3 <sup>b</sup> ± 0,85	18,26 <sup>b</sup> ± 1,7	25,87 <sup>a</sup> ± 1,07
C	13,02 <sup>c</sup> ± 0,6	18,16 <sup>b</sup> ± 0,8	19,20 <sup>b</sup> ± 1,71	26,56 <sup>a</sup> ± 1,04
h	115,20 <sup>a</sup> ± 1,2	106,9 <sup>b</sup> ± 0,83	108,1 <sup>b</sup> ± 1,52	103,04 <sup>c</sup> ± 0,6

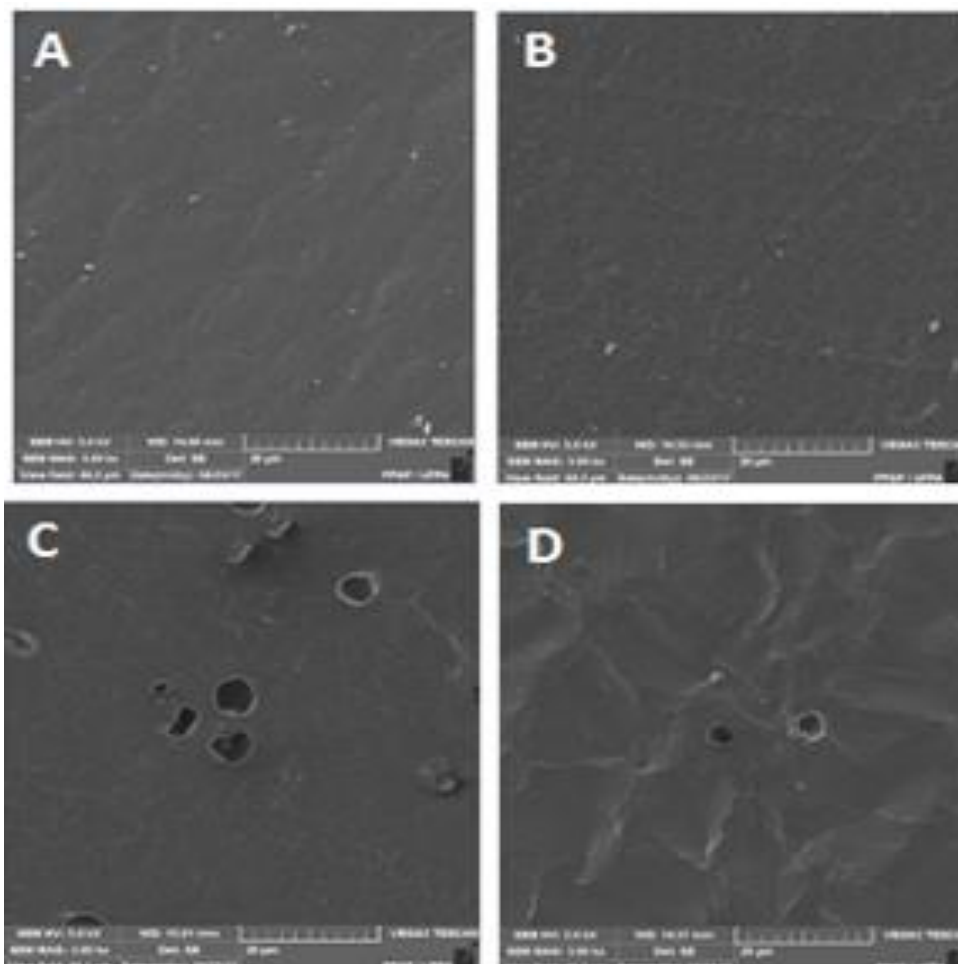
RT: Resistência a Tração; PVA: Permeabilidade a Vapor de Água; Cor: L\* (Luminosidade); a\* (verde-vermelho); b\* (azul-amarelo); C (croma); h (Ângulo Hue). F1: 0%; F2: 1%; F3: 1,5%; F4: 2%.

Os valores de espessura e PVA dos biofilmes não apresentaram diferença ( $p \geq 0,05$ ) entre eles (Tabela 2). Houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os valores de solubilidade dos filmes de gelatina adicionados de OEC, sendo que o F2 apresentou menor solubilidade. Os índices de solubilidade encontrados neste trabalho foram próximos ao relatados por

Gómez-Estaca *et al.* (2010) de 41,1%, que ao incorporar óleo essencial de cravo verificou um aumento significativo na solubilidade do biofilme.

Os biofilmes apresentam alto valor de L\* luminosidade (Tabela 2), sem diferença entre as formulações F1 e F3, assim como entre F2 e F4, no entanto, apresentam diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre estes dois grupos. Os valores para cromaticidade -a\* encontrados nesta pesquisa foram mais elevados que os encontrados por Wolf (2007) de -0,59 a -0,76 com tendência a cor verde clara. O parâmetro +b\* foi influenciado pela adição do óleo essencial de cravo. O croma C\* apresentou diferença entre os biofilmes ( $p \leq 0,05$ ). O valor do ângulo Hue (h) apresenta diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os biofilmes, sendo observado decréscimo nos valores conforme aumenta a adição de OEC confirmando o comportamento de mudanças de cor devido à incorporação de óleo essencial de cravo.

Os resultados da microscopia eletrônica da superfície dos biofilmes de gelatina contendo OEC estão apresentados na Figura 2. As imagens obtidas dos biofilmes de gelatina mostram uma estrutura homogênea e com poucas irregularidades nos biofilmes F1 e F2. Os biofilmes F3 e F4 apresentam bolhas que devem ser evitadas pois podem prejudicar o processo de conservação do alimento embalado. As imagens também revelam pontos brancos, também observados nos filmes de proteína miofibrilar, onde podem ser componentes não solubilizados.



**Figura 2.** Microfotografias da superfície dos biofilmes de gelatina com adição de óleo essencial de cravo, com ampliação de 3.000 x: A (F1); B (F2); C (F3); D (F4).

Nos testes de suscetibilidade antimicrobiana utilizando o óleo essencial de cravo os halos resultantes foram excelentes, quando comparados com aos obtidos por antibióticos sintéticos padrões, Ampicilina (10 ug) e Vancomicina (30 ug), que foram utilizados como controles positivos (Tabela 3).



Tabela 3. Atividade antimicrobiana para biofilmes incorporados de óleo essencial de cravo.

Biofilmes	Formulações	Zona Inibitória (mm)*			
		<i>S.typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>
Proteína Miofibrilar	F1	0	0	0	0
	F2	0	0	11±0,1	10±0,1
	F3	0	0	13±0,1	11±0,1
	F4	0	0	13±0,1	12±0,1
Gelatina	F1	0	0	0	0
	F2	0	0	0	0
	F3	0	0	0	0
	F4	0	0	0	0
Óleo puro (20 uL)		14±0	16±0	20±0	13±0
Ampicilina** (10 ug)		15±0	16±0		
Vancomicina** (30 ug)				20±0	17±0

F1: 0%; F2: 1%; F3: 1,5%; F4: 2%. \*Os valores dos diâmetros mensurados da zona inibitória foram expressos em milímetro (mm). \*\*Controles - Ampicilina (10ug) e Vancomicina (30ug).

Os biofilmes de proteína miofibrilar apresentaram efeito inibitório nas concentrações utilizadas frente às bactérias Gram positivas (Tabela 3). Essas bactérias apresentam membrana celular lipofílica o que facilita a penetração de compostos hidrofóbicos.

Segundo Burt (2004) grande parte dos estudos que investigam a ação dos óleos essenciais em relação aos micro-organismos patogênicos em alimentos concordam que os óleos são mais ativos em bactérias Gram-positivas que nas Gram-negativas. No presente estudo a ineficiência do antimicrobiano para Gram-negativas (Tabela 3) está relacionada às paredes celulares destas bactérias que são constituídas de fosfolipídios, lipopolissacarídeo e proteínas que conferem impermeabilidade aos agentes antibacterianos, além de bloquear a penetração de compostos hidrofóbicos e evitar seu acúmulo nas membranas das células, aumentando a resistência (Burt, 2004).

Além da estrutura das membranas celulares bacterianas, a quantidade de óleo essencial adicionada nas formulações dos biofilmes foi insuficiente para combater a resistência das bactérias Gram-negativas, incapaz de bloquear as funções metabólicas (Silveira et al., 2006).

Os biofilmes de gelatina com OEC não inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Tabela 3). Segundo Gómez-Estaca et al. (2010) esse comportamento pode ser atribuído aos diferentes graus de interação da gelatina, em função da sua origem e composição, com os polifenóis presentes na composição do óleo essencial (eugenol,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humoleno) (Scherer et al., 2009), que podem afetar a capacidade dos compostos antimicrobianos.

O resultado da análise de componentes principais das avaliações realizadas nos biofilmes considerou o critério de Kaiser (Kaiser, 1960), selecionando autovalores superiores a 1, assim os componentes principais selecionados foram CP1 e CP2. Os componentes principais (CP) explicaram uma variação acumulada de 85,7% do biofilme de PM. O CP1 foi explicado principalmente pelas variáveis relacionadas à coloração  $L^*$  e ângulo Hue (h), e o CP2 pela alongação. Para o biofilme produzido com gelatina dois CP's também foram suficientes para explicar a variação com um total acumulado de 77,5%. Os parâmetros  $b^*$  e C foram as principais variáveis para CP1, para o CP2 foi principalmente a solubilidade e o  $L^*$ .

As medições em CP são interpretadas de acordo com as correlações entre cada um dos parâmetros com cada componente principal, assim medições próximas umas das outras, são positivamente correlacionadas, medidas separadas  $180^\circ$  são negativamente correlacionadas, enquanto que se elas estão separadas por  $90^\circ$ , são independentes.

No gráfico de projeção de medidas do biofilme elaborado com as PM relacionadas aos componentes principais (CP1 e CP2), mostram as correlações entre variáveis e entre essas variáveis e os CP. As variáveis  $L^*$ , h e RT estão localizadas próximas ao primeiro componente (Figura 3A), opostos a espessura, intumescimento e solubilidade, que estão correlacionadas negativamente. Desta forma, biofilmes produzidos com PM com valores mais elevados de  $L^*$ , h e RT, apresentaram menores valores de espessura, intumescimento e solubilidade. A alongação e PVA tiveram grande influência para caracterizar o CP2, sendo negativamente correlacionada com  $b^*$ , C, e  $a^*$ , altamente correlacionadas entre si.

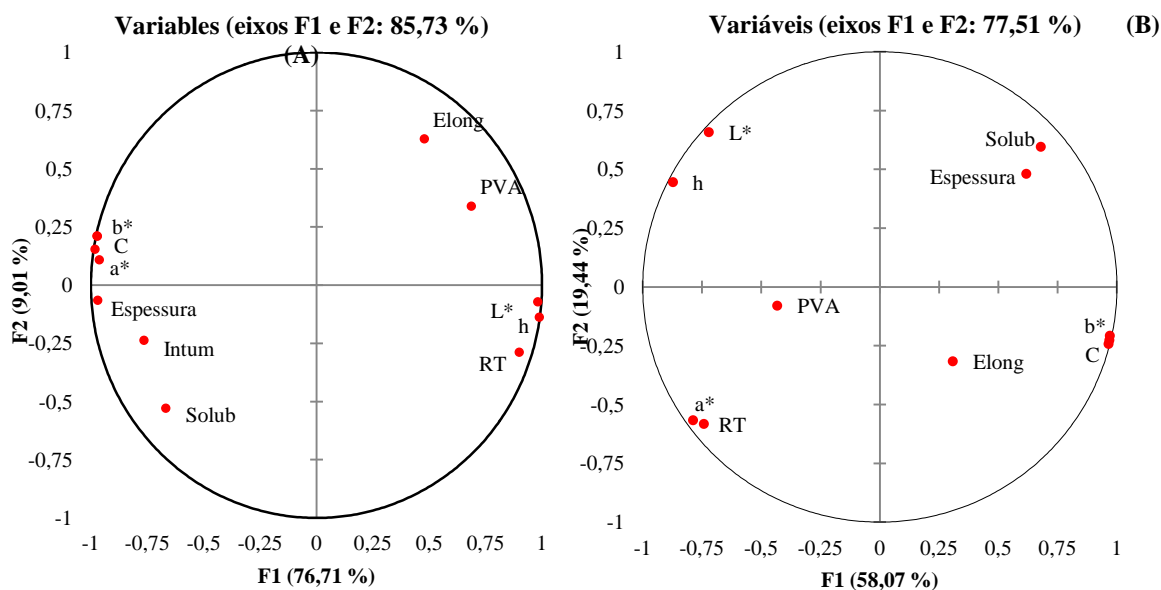


Figura 3. Projeção das medições de biofilme produzido com proteínas miofibrilares (A) e gelatina (B) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais.

Observando o gráfico de projeção das medidas do biofilme de gelatina (Figura 3 B) relacionado aos CP 1 e 2, verificam-se que as variáveis alongação,  $b^*$  e C estão localizadas próximas ao primeiro componente, opostas a PVA,  $a^*$  e RT, estando portanto correlacionadas negativamente. Desta forma, os biofilmes de gelatina com adição de OEC apresentaram baixos valores de PVA,  $a^*$  e RT, e elevados valores de alongação,  $b^*$ , e C. Os parâmetros de solubilidade e espessura, por estarem altamente correlacionadas entre si, tiveram grande influência na caracterização do CP2, sendo esses parâmetros correlacionados negativamente com  $a^*$  e RT; L e h com alongação,  $b^*$ , e C.

## CONCLUSÃO

Biofilmes com adição de óleo essencial de cravo apresentaram excelentes propriedades tecnológicas: baixos valores de permeabilidade a vapor d'água e altos de alongação e cor clara. Os biofilmes de proteínas miofibrilares apresentaram efeito inibitório nas concentrações utilizadas frente às bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus fecalis*, mas os biofilmes de gelatina não inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A utilização de óleo essencial de cravo em filmes de proteínas miofibrilares de peixe pode atuar como antimicrobiano, em embalagens

ativas, aumentando a vida comercial (*shelf life*) e a segurança no armazenamento dos alimentos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela concessão de bolsa de Mestrado ao primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

### **Literatura Citada**

Akhtar, M.J.; Jacquot, M.; Jamshidian, M.; Imran, M.; Arab-Tehrany, E.; Desobry, S. Fabrication and physicochemical characterization of HPMC films with commercial plant extract: Influence of light and film composition. *Food Hydrocolloids*, v.31, p.420-427. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.008>.

Arfat, Y.A.; Benjakul, S.; Prodpran, T.; Osako, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, v.39, p.58-67. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.028>

Ayala-Zavala, J.F.; González-Aguilar, G.A.; Del-Toro-Sánchez, L. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. *Journal Food Science*, v.74, p.84-91. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01294.x>

Bueno, C.M.; Alvim, I.D.; Koberstein, T.C.R.D.; Portella, M.C.; Grosso, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.14, p.65-73. 2011. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140100009>

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, p.223-253. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 19 ed, 26(1), USA. 2006.

Cortez-Vega, W.R.; Bagatini, D.C.; Souza, J.T.A.; Prentice, C. Nanocomposite biofilms obtained from whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and monmorilonite: Evaluation of the physical, mechanical and barrier properties. *Journal of*

Food Technology, v.16, p.90-98. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000011>

Davanço T, Tanada-Palmu, P.; Grosso, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou caprótico: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 408-416, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200034>.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30, p. 374-381, 2007.

Gómez-Estaca, J.; López De Lacey, A.; López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, P. Biodegradable gelatin chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, v.27, p.889-896, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>.

Gontard, N.; Duchez, C.; Cuq, J.; Guilbert, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. *International Journal Food Science Technology*, v. 29, p.39-50, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb02045.x>

Kaiser, H. Directional statistical decisions. *Psychological Review*, v.67, p.160–167, 1960. <http://dx.doi.org/10.1037/h0047595>

Lee, K.Y.; Shim, J.; Lee, H.G. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*, 56(2):51-54. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.04.001>

Limpan, N.; Prodpran, T.; Bemjakul, S.; Prasarnpran, S. Properties of biodegradable blend films on fish protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. *Journal of Food Engineering*, v.100, p.85-92, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.031>

Matta Junior, M.D.; Sarmiento, S.B.S.; Sarantópoulos, C.I.G.L.; Zocchi, S.S. Propriedades de Barreira e Solubilidade de Filmes de Amido de Ervilha Associado com Goma Xantana e Glicerol. *Polímeros*, v.21, p.1- 6, 2011.

Mattei, D.; Guimarães, L.F.; Ferreira, F.B.P.; Santos, S.R.S.R.; Martin, A.A.; Gazim, Z.C.; Dragunski, D.C. Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes a base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* L. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, v.16, p.129-136, 2013.

Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L. Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from

sunflower protein isolate. *Polymer*, v.43, p.5417–5425, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00434-2)

Santos, J.C.; Carvalho Filho, C.D.; Barros, T.F.; Guimarães, A.G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Semina: Ciências Agrárias*, v.32, p.1557- 1564, 2011. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557>

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, v.11, p.442-449, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>.

Silveira, G.P.; Nome, F.; Gesser, J.C.; Sá, M.M.; Terenzi, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, 29:844-855, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400037>.

Souza, E.L.; Lima, E.O.; Freire, K.R.L.; Sousa, C.P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, p.245-250. 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000200011>

Turhan, K.N.; Sahbaz, F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methycellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, v.61, p.459-466. 2004. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00155-9)

Ushimaru, P.K.; Silva, M.T.N.; Di, S.C.; Barbosa, L.; Fernandes Junior, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 717-719. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000400024>

Wolf, K.L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados com fibra e colágeno. São José Rio Preto/SP: Universidade Estadual Paulista, 2007. 103p. Dissertação de Mestrado.

Zavareze, E.R.; Halal, S.L.M.; Silva, R.M.; Dias, A.R.G.; Prentice-Hernández, 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. 38, p.1973-1981, 2014. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12173>