

EFEITO DE FILMES PROTEICOS À BASE DE ISOLADO PROTEICO DE ANCHOITA (*Engraulis anchoita*) INCORPORADOS COM ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE A CONSERVAÇÃO DE CARNE BOVINA

M. da ROCHA¹, M.M de SOUZA¹, M.A CARDOSO¹, J.E. RAFFI¹, e C.H PRENTICE¹.

¹ Universidade Federal de Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
E-mail para contato: meriportela@yahoo.com.br

RESUMO – O efeito do filme à base de isolado proteico de anchoita contendo 1,50% de ácido benzoico (AB) ou ácido sórbico (AS) foi testado em carne bovina inoculada com *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* armazenada durante 12 dias a 5°C. Também foram avaliadas as propriedades mecânicas e morfológicas dos filmes. Os filmes com 1,50% de AS ou AB aplicados em carne bovina apresentaram a maior inibição da multiplicação da *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 em relação ao filme controle. Filmes contendo AB ou AS não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a resistência a tração. Entretanto, filmes contendo AS apresentaram maior elongação até a ruptura em relação ao filme contendo AB. As imagens de microscopia eletrônica de varredura na superfície do filme revelaram microporos em filmes contendo 1,50% de AS, resultando em filmes com menor homogeneidade. Este estudo demonstrou que a incorporação desses antimicrobianos em filmes é uma alternativa como embalagem ativa.

1. INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos seguros impulsiona a busca por mecanismos de controle sobre a segurança dos mesmos. Surto de doenças transmitidas por alimentos (DTA) criaram a necessidade pela busca de métodos alternativos para o controle da multiplicação microbiana nos alimentos (Appendini e Hotchkiss, 2002). Entre estes métodos, encontram-se a incorporação de agentes antimicrobianos em filmes biodegradáveis, que podem ser utilizados como embalagens ativas (Falguera *et al.*, 2011). Os filmes podem ser elaborados a partir de macromoléculas, tais como proteínas, polissacarídeos e lipídeos, as quais podem formar matrizes contínuas e coesas (Rocha *et al.*, 2013). As proteínas se destacam dos demais, pois possuem uma estrutura com 20 monômeros diferentes, o que confere uma ampla gama de propriedades funcionais, especialmente um potencial para ligações intermoleculares importantes para as propriedades dos filmes (Ou *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2013). As proteínas miofibrilares do pescado são estudadas em inúmeros trabalhos (García e Sobral, 2005; Zavareze *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2013). Elas são insolúveis em água, mas podem ser extraídas através da variação de pH da solução (Martins *et al.*, 2011). A anchoita (*Engraulis anchoita*)

é um pescado pelágico pouco explorado, mas amplamente disponível na litoral sul do Brasil, o qual desperta interesse para o desenvolvimento de produtos com alto valor agregado, tal como os isolados proteicos (Castello e Castello, 2003; Rocha *et al.*, 2013). O uso de filmes contendo agentes antimicrobianos apresenta vantagens sobre os métodos tradicionais de adição direta de conservantes nos alimentos, visto que podem ser liberados de maneira controlada, estando, portanto, em menor quantidade no alimento e atuando, principalmente, na superfície do produto. Também pode ocorrer a inibição ou redução da atividade do antimicrobiano, quando adicionado de forma tradicional, por diversas substâncias do próprio alimento (Quintavalla e Vicini, 2002).

Dentre os conservantes utilizados em alimentos, os ácidos orgânicos merecem destaque por possuírem baixa interferência no sabor e baixo nível de toxicidade. Substâncias como ácido sórbico, ácido benzóico e seu sais são conservantes de alimentos “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS) (Buonocore *et al.*, 2003). Os antimicrobianos ao serem incorporados em material de embalagem, podem afetar as propriedades físicas (Quintavalla e Vicini, 2002) e mecânicas do filme obtido. Limjaroen *et al.* (2003) observaram um decréscimo na transparência do filme com adição de sorbato de potássio, porém não houve mudanças nas propriedades de tensão. Cagri *et al.* (2001) verificaram que filmes a base de isolado proteico de soro de leite, incorporados com ácido sórbico, inibiram a multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7. Manab *et al.* (2011) incorporaram ácido benzóico em filmes elaborados a base de isolado proteico de soro de leite, o qual inibiu significativamente *E.coli*. As bactérias *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* são agentes causadores de DTA's, que despertam o interesse pelo desenvolvimento de filmes biodegradáveis incorporados com antimicrobianos que atuam sobre a multiplicação e lise desses, minimizando a ocorrência de surtos de origem alimentar. A carne está exposta a contaminações de natureza microbiana em todas as fases do seu processamento, particularmente nas operações em que é mais manipulada e sempre que não são tomados cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Fabricação. A carne e os produtos cárneos são um dos principais veículos de DTA, também são propensos a deterioração durante o armazenamento como todos os alimentos proteicos (Cárdenas *et al.*, 2008). Uma das formas de controlar a multiplicação de micro-organismos nestes produtos, aumentando a segurança dos alimentos, é a aplicação de antimicrobianos na superfície do produto (Kerry *et al.*, 2006). Portanto, os objetivos desse trabalho foram avaliar o efeito de filmes proteicos à base de isolado proteico de anchoita (*Engraulis anchoita*) incorporados com ácidos orgânicos sobre a conservação de carne bovina inoculada com *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* e as características mecânicas e morfológicas desses filmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

O isolado proteico de anchoita (IPA) foi obtido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) utilizando o método de variação de pH (*pH-shifting*) segundo metodologia descrita por Rocha *et al.* (2013). O IPA foi analisado em triplicata para determinar o teor de proteína por metodologia descrita pela AOAC (2000) e o mesmo apresentou 88,8% de proteína. A carne bovina refrigerada foi obtida em um supermercado local da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

2.2 Micro-organismos

As bactérias utilizadas nesse estudo, *E. coli* O157:H7 e a *L. monocytogenes*, foram fornecidas pela Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS).

2.3 Elaboração dos filmes antimicrobianos

A elaboração dos filmes à base de IPA foi realizada segundo metodologia descrita por Rocha *et al.* (2013) e Cagri *et al.*, (2001) adaptada. Os filmes de IPA foram preparados pela técnica *de casting*, sob condições alcalinas. As soluções filmogênicas (SF) foram obtidas pela dispersão de 3,0 g IPA em 100 mL de água destilada, em reator de vidro acoplado com banho ultratermostático (Quimis, 214D2, São Paulo) e foram homogeneizados sob agitação constante a 25 °C, durante 25 min. O pH da solução filmogênica foi ajustado para 11,5 com solução de NaOH (1 M), para solubilização das proteínas. Então, foi adicionado 30 g glicerol/ 100 g de IPA SF e homogeneizado a 10.000 rpm durante 20 min em homogeneizador Ultra-turrax (IKA, T25 digital, Werke, Alemanha). Esta solução foi aquecida à temperatura de 74 °C, em reator de vidro acoplado com banho ultratermostático sob agitação constante durante 30 min. A SF foi filtrada (para remoção de resíduos sólidos não dissolvidos) e resfriada em banho de água a 23 ± 2 °C. Como controle foi utilizado o filme sem adição dos agentes antimicrobianos. Após, o ácido sórbico (AS) ou benzoico (AB) foram adicionados na SF na concentração de 1,50% (p/v). Então, foram homogeneizados sob agitação constante durante 20 min e o pH ajustado para 5,2 com solução de HCl (1M). As SF foram espalhadas em placas de Petri de acrílico estéreis (9 cm) e desidratadas em estufa com circulação de ar (Fanem, 520, São Paulo, Brasil) a 35 °C durante 16 h. Então, os filmes foram acondicionados a 25°C durante 48 h, sendo então submetidos aos diferentes testes.

2.4 Caracterização dos filmes antimicrobianos

2.4.1 Propriedades mecânicas

A resistência à tração (*RT*) e a elongação até a ruptura (*E*) dos filmes foram determinadas, em triplicata, segundo metodologia da ASTM D-882-91 (1996), em 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 de 50 mm e velocidade de tração de 0,8 mm/s. A *RT* foi calculada dividindo-se a máxima força para rompimento do filme pela área de seção transversal do mesmo. A *E* foi calculada dividindo-se o alongamento na ruptura do filme pelo comprimento inicial da amostra, multiplicando por 100.

2.4.2 Microestrutura dos filmes

Os estudos da microestrutura dos filmes foram realizados em filmes controle e com a adição dos diferentes agentes antimicrobianos, através da microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6060, Japão) operando a 10 kV. As amostras dos

filmes foram colocadas em suporte de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro (Sputter Coater, SCDO50). As imagens foram feitas com 2000 x de ampliação.

2.4.3 Aplicação dos filmes de maior atividade antimicrobiana em carne bovina

A carne bovina foi cortada em pequenos pedaços (2,1 x 2,5 x 1,0 cm) de $5,0 \pm 0,2$ g utilizando uma faca de aço inoxidável estéril. As amostras foram imersas e homogeneizadas em água peptonada estéril 0,1% (p/v) contendo cerca de $4,7 \times 10^5$ e $4,9 \times 10^4$ UFC/ml do inóculo de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157: H7, durante 1 min. Essas foram envoltas assepticamente, em forma de cruz, pelos filmes antimicrobianos cobrindo toda a superfície da carne. As amostras controle foram embaladas em filmes de polietileno. As amostras de carne foram colocadas em placas de Petri estéreis e armazenadas a $5,0 \pm 2,0$ °C. Todas as amostras foram avaliadas microbiologicamente em 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento, segundo Zinoviadou *et al.* (2010). A carne bovina foi caracterizada quanto sua composição proximal, segundo AOAC (2000). Durante o armazenamento, foram realizadas contagens dos micro-organismos pelo método de plaqueamento em gotas, segundo Silva *et al.* (2001) com adaptações. Os filmes foram removidos assepticamente das amostras de carne ($5,0 \pm 0,2$ g) e foram adicionados em 45 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril juntamente com a carne bovina e homogeneizadas durante 1 minuto a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas diluições em série (10^{-1} – 10^{-7}). As placas contendo os meios, foram divididas em quadrantes e armazenadas durante 24 h a 30 - 35 °C antes de serem utilizadas para garantir a secagem rigorosa das placas. Em seguida 30 µL de cada diluição foram inoculados em cada quadrante, em triplicata. As placas foram mantidas em uma superfície plana, para absorção do inóculo pelo meio de cultura, durante 30 min. Então, foram incubadas invertidas durante 24 h a 37 °C. Os resultados foram expressos pela média da triplicata em UFC/g.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes à base de IPA incorporados com os diferentes ácidos orgânicos e sem adição de antimicrobianos (controle) apresentaram-se homogêneos e de fácil manuseio

3.1 Propriedades mecânicas

Com o acréscimo nas concentrações dos agentes antimicrobianos de 0 para 1,50% ocorreu um aumento na elongação de 9,0% para 121,3% e de 9,0% para 97,0% para os filmes incorporados com AS e AB, respectivamente. Contudo, a RT dos filmes diminui de 3,9 MPa para 1,1 MPa e 3,9 MPa para 1,2 MPa com a adição de 0% para 1,50% de AS e AB, respectivamente. Dentre as propriedades estudadas em filmes, a resistência a tração e a elongação são as respostas comumente relatadas para descrever as propriedades mecânicas dos filmes, pois estas são determinantes na aplicação do mesmo. Essas propriedades são influenciadas pela interação da proteína, água, plastificante e agente antimicrobiano (Sivaroban *et al.*, 2008). Os filmes contendo AS apresentaram uma elongação superior quando comparado aos filmes contendo AB e o controle. Esse fato se deve porque o AS possui a estrutura de uma cadeia linear, penetrando facilmente nas cadeias de proteína, em comparação ao AB que possui um anel de benzeno. Consequentemente, o AS oferece maior

mobilidade entre as cadeias de proteína, fazendo com que o filme apresente menor RT e maior flexibilidade (Cagri *et al.*, 2001). Ramos *et al.* (2012) em seus estudos com filmes elaborados a base de isolado protéico de soro de leite, incorporados com ácido propiônico, verificaram que a adição deste na solução filmogênica resulta em filmes com maior variação nas propriedades mecânicas, sendo maior para a elongação (93%) e menor para resistência a tração (0,1 MPa). Estes resultados são inferiores, aos encontrados no presente estudo no qual filmes incorporados com 1,50% de AS e AB apresentaram valores de 1,1 MPa e 1,2 MPa para RT, 121,3% e 97,0% para elongação, respectivamente.

3.2 Microestrutura dos filmes

O filme controle, apresentado na Figura 1a, apresentou uma superfície compacta e lisa, sugerindo que foi formada uma matriz ordenada.

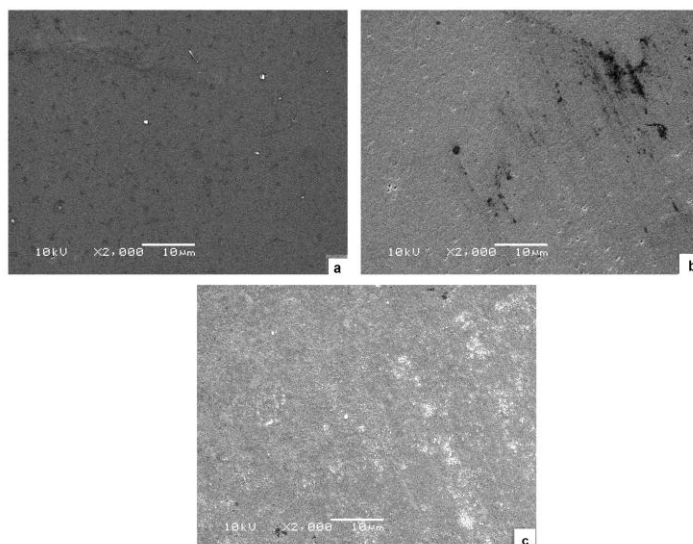


Figura 1 - Micrografias da superfície dos filmes (a) controle; (b) 1,50% de ácido sórbico; (c) 1,50% de ácido benzóico.

O filme contendo 1,50% de AS, Figura 1b, apresentou pequenos poros uniformemente distribuídos ao longo do filme. Essas discontinuidades, na estrutura do filme, possivelmente, proporcionaram a formação de vias preferenciais para difusão do vapor de água, durante a secagem para eliminação do ar incorporado durante a agitação no processo de elaboração dos filmes (Rocha *et al.*, 2011). O filme contendo 1,50% de AB, Figura 1c, apresentou uma superfície rugosa, a qual proporciona facilidade na permeação do vapor de água

3.3 Aplicação dos filmes de maior atividade antimicrobiana em carne bovina

A Figura 2 apresenta a contagem pelo método de plaqueamento em gotas de micro-organismos das amostras de carne bovina inoculadas com *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* e embaladas com e sem filmes antimicrobianos durante o armazenamento a 5,0 °C. Como pode ser visto, foi observada

diferença significativa ($p < 0,05$) entre a *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, mas não entre os filmes antimicrobianos e o controle no primeiro dia de armazenamento (dia zero), devido a diferença de conteúdo de inóculo inicial dos micro-organismos adicionados na amostra.

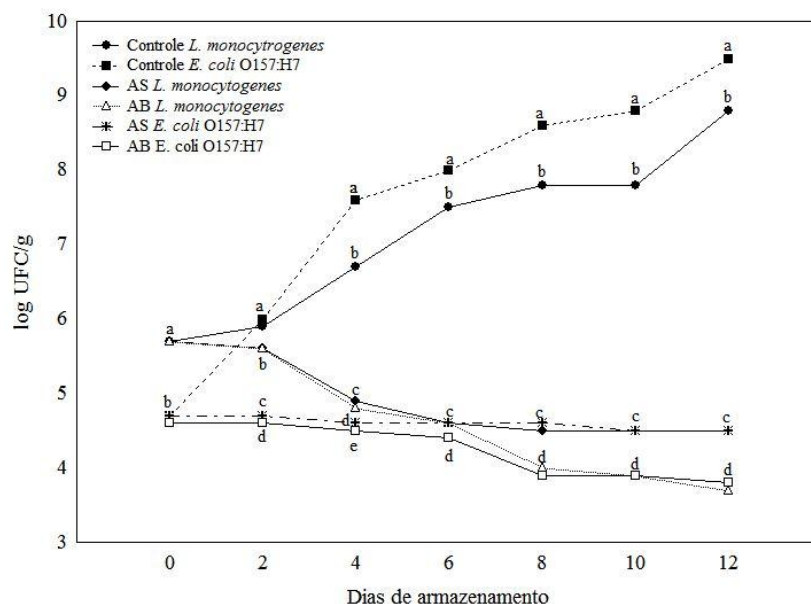


Figura 2 - Efeito dos filmes antimicrobianos (p/v) sobre a multiplicação de *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em carne bovina.

Filmes contendo AS tiveram uma diminuição no *E. coli* O157: H7 e *L. monocytogenes* em 5 e 4 log UFC / g, enquanto o filme AB tiveram uma diminuição em 6 e 5 log UFC / g em relação ao controle filme no 5 ° C durante 12 dias de armazenamento. Esta redução pode ser atribuída a um decréscimo no pH interno das células microbianas, produzidos por ionização de moléculas de ácidos orgânicos não dissociados, que somado ao rompimento do transporte do substrato, ocasiona alterações na membrana ou na permeabilidade celular que são essenciais para a multiplicação microbiana (Ramos *et al.*, 2012). Esses resultados confirmam que os filmes produzidos por IPA incorporada com AS e AB foram eficazes no controle da multiplicação de *E. coli* O157: H7 e *L. monocytogenes*.

4. CONCLUSÃO

Os filmes antimicrobianos aplicados em carne bovina, inoculada com *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, inibiram a multiplicação desses micro-organismos. As propriedades dos filmes de isolado proteico foram afetadas pela adição do ácido sórbico e ácido benzoico. A adição de concentrações de ácido sórbico e ácido benzoico mostrou maior elongação. Entretanto, ocorreu uma diminuição na resistência a tração dos filmes antimicrobianos, quando comparado ao filme controle. As imagens de microscopia eletrônica de varredura na superfície do filme revelaram microporos nos filmes contendo 1,50% de ácido sórbico. Devido a esses fatores, o filme antimicrobiano elaborado no presente estudo apresenta características promissoras para a aplicação em potencial em alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*. 17 edição. Maryland: AOAC, 2000.

Appendini, P.; Hotchkiss, J.H. Review of Antimicrobial Food Packaging. *Innovative Food Sci. & Emerg. Technol.*, v.3, p.113, 2002.

ASTM.; American Society for Testing and Materials. *Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting*, Designation D882-91. In Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 1996.

Buonocore, G. G.; Del Nobile, M. A.; Panizza, A.; Corbo, M. R.; Nicolais, L. A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications. *J. of Controlled Release*, v. 90, p. 97–107, 2003.

Cárdenas, F. C., Giannuzzi, L., & Zaritzkay, N. E. (2008). Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Meat Sci.*, 79, 509–520.

Castello, L.; Castello, J. P. Anchovy stocks (*Engraulis anchoita*) and larval growth in the SW Atlantic. *Fisheries Res.*, v. 59, p. 409-421, 2003.

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 Microbiol. and Saf.*, v.66, p.865-870, 2001.

Falguera, V.; Quintero, J.P.; Jiménez, A.; Muñoz, J.A.; Ibarz, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Sci. & Technol.*, v.22, p.292-303, 2011.

García, F.T.; Sobral, P.J.A. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. *Food Sci. and Technol.*, v.38, p.289-296, 2005.

Kerry, J.P., O’Grady, M.N., Hogan, S.A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and musclebased products: a review. *Meat Sci.*, 74, 113–130.

Limjaroen, P.; Ryser, E., Lockhart, H.; Harte, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. *J. of Plastic Film and Sheeting*, v.19, p.95-109, 2003.

Manab, A.; Sawitri, M. E.; AL Awwaly, K. U.; Purnomo, H. Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. *Afri. J. of Food Sci.*, v. 5, p. 6–11, 2011.

Martins, V. G.; Costa, J. A. V.; Damodaran, S.; Prentice, C. Chemical Modification and Structural Analysis of Protein Isolates to Produce Hydrogel using Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Wastes. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, v.164, p.819-825, 2011.

Ou, S.; Wang, Y.; Tang, S.; Huang, C.; Jackson, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *J. of Food Eng.*, v.70, p. 205-210, 2005.

Quintavalla, S.; Vicini, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.*, v.62, p.373–380, 2002.

Ramos, O.L.; Silva, S.I.; Soares, J.C.; Fernandes, J.C.; Poças, M.F.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Res. Int.*, v.45, p.351–361, 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. *J. of Food Eng.*, v.116, p.666-673, 2014.

Silva, N.; Junqueira, V.; Silveira, N.F.A.; *Manual de Métodos de Análise Microbiológica*, São Paulo: Varela, 316p., 2001.

Sivaroooban, T.; Hettiarachchy, Johnson, M.G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res. Int.*, v.41, p.781–785, 2008.

Zavareze, E.R.; Halal, S.L.M.; Telles, Campello, A.; Prentice, C.H. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. *Braz. J. Food Technol.*, v.15, p.53-57, 2012.

Zinoviadou, K. G.; Koutsoumanis, K. P.; Biliaderis, C. G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, v.24, p.49–59, 2010.