



CARACTERIZAÇÃO DE FILMES ANTIMICROBIANOS A BASE DE ISOLADO PROTEICO DE SORO/METABISSULFITO DE SÓDIO

Natália de M. Ladeira¹, Rodrigo de A. Soares^{2*}, Elisabeth M. C. da Silva², Soraia V. Borges¹, Marali V. Dias¹, Roberta H. Piccoli¹, Viviane M. de Azevedo¹

1 - Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

2 - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE.

prof.rodrigo.araujo@gmail.com

Resumo: Objetivou-se caracterizar as propriedades dos filmes a base de Isolado Proteico de Soro de Leite (IPS) com atividade antimicrobiana. Após a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a *Salmonella* Enteritidis, optou-se pela utilização do metabissulfito de Sódio (MBS). Filmes de IPS (60 mg/mL de solução) contendo o conservante MBS (0,55 mg/mL) e diferentes concentrações de glicerol (0,37 e 0,41 mg/mg de IPS) e montmorilonita (MMT) (0, 0,01 e 0,03 mg/mg de IPS) foram caracterizados quanto a permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência a tração (RT) e diâmetro de halo inibitório (DHI). Nota-se influência do glicerol na redução da RT, enquanto o MMT agiu aumentando a PVA. Houve ação antimicrobiana em todos os filmes testados. Conclui-se que o filme sem MMT contendo 0,37 mg de glicerol/mg de IPS apresentou os maiores valores de RT e DHI, e menor PVA.

Palavras-chave: Embalagens, *Salmonella*, diâmetro de halo inibitório.

Characterization of antimicrobial films based on whey protein isolate/sodium metabisulfite

Abstract: The objective of this study was to characterize the properties of the films based on whey protein isolate (WPI) with antimicrobial activity. After determination of Minimum inhibitory concentration (MIC) against *Salmonella* Enteritidis, sodium metabisulfite (SMB) was chosen. Edible films were prepared with WPI (6g/100 mL solution) containing SMB (0,55 mg/mL) and variations of glycerol (0,37 and 0,41 mg/ mg WPI) and montmorillonite (MMT) (0, 0,01 and 0,03 mg/mg WPI) contents. Films were characterized about water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS) and diameter of inhibition zones (DIZ). It was concluded the influence of glycerol on reduction of RT, while MMT increased PVA. There was antimicrobial activity of all films tested. Concluded that the film without MMT containing 0,37 mg of glycerol/mg WPI showed the highest RT and DIZ and the smaller WVP.

Keywords: Packaging, *Salmonella*, diameter of inhibition zones.

Introdução

Nos últimos anos as pesquisas na área de embalagens para alimentos têm focado no uso de materiais biodegradáveis para a elaboração de filmes e revestimentos comestíveis a base de biopolímeros como carboidratos e proteínas, sozinhos ou combinados [1]. Este tipo de embalagem natural tem mostrado ser uma ótima solução para a extensão da vida útil e segurança tanto de alimentos de origem vegetal [2] quanto animal [3].

Os filmes de isolado proteico do soro de leite (IPS) são uma alternativa para produção de embalagens alimentares devido a suas características de transparência, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para o consumo [4]. Além disso, o uso dessa matéria-prima pode reduzir impactos ambientais visto que essas proteínas muitas vezes são descartadas ou subutilizadas como ração animal, sendo considerado um subproduto ou rejeito da indústria laticinista. Filmes produzidos exclusivamente de concentrados ou isolados de proteínas do soro do leite, mostram-se quebradiços, tornando inviável a utilização para produção de embalagens ou revestimentos. Assim, faz-se necessário incorporar plastificantes às matrizes poliméricas a fim de melhorar suas propriedades mecânicas [5]. Dentre os plastificantes utilizados em filmes biodegradáveis, os mais

usados são os polióis (glicerol, sorbitol, derivados da glicerina e gliceróis), lipídeos (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactante e triacetina).

Os revestimentos e filmes elaborados a partir de proteínas possuem boa barreira ao O₂ e ao CO₂ em ambientes com baixa umidade relativa devido à susceptibilidade deste absorver umidade e se dissolver [6]. Devido a seu caráter hidrofílico, revestimentos a base de proteínas costumam ser adicionados de alguma substância hidrofóbica a fim de reduzir a permeabilidade ao vapor de água [7]. Azevedo e colaboradores [8], avaliando as propriedades de um filme a base de IPS, conseguiram reduzir para menos da metade os valores de permeabilidade ao vapor de água da película ao adicionar Montmorilonita (MMT) e ácido cítrico a formulação. A MMT é um tipo de argila que pode ser utilizada em embalagens para alimentos reforçando, de forma natural e não tóxica, sua estabilidade química e térmica [9].

O uso de filmes que contém agentes antimicrobianos tem demonstrado ser uma ferramenta útil na proteção de produtos alimentares contra micro-organismos deterioradores e na redução do risco de crescimento de patógenos. Estudos realizados por Banks e Board [10] envolvendo a conservação de salsichas, demonstraram que diversos sorotipos de *Salmonella* foram sensíveis ao metabissulfito de sódio em concentrações de 0,015-0,109 mg/mL. Já em molho inglês, esta bactéria foi inibida com uma concentração de 0,6 mg/mL de SO₂. O dióxido de enxofre e seus derivados são adicionados aos alimentos para inibir o escurecimento não enzimático e as reações catalisadas por enzimas, além do controle de microrganismos e como antioxidantes. Seu uso é controlado devido à ocorrência de reações graves em indivíduos asmático sensíveis. As formas de uso mais comuns nos alimentos incluem gás, sais de sódio, potássio ou cálcio, de sulfito, bissulfito e metabissulfito [11].

Assim, objetivou-se caracterizar filmes a base de IPS, MMT e MBS em relação a permeabilidade ao vapor de água, resistência tração e atividade antimicrobiana.

Experimental

Desenvolvimento dos filmes

Para a determinação da quantidade de MBS a ser adicionada aos filmes, foram realizados testes de concentração mínima inibitória *in vitro* deste composto e verificou-se que esta concentração foi de 0,55mg/mL para apresentar efetividade frente a *Salmonella* Enteritidis [12]. Na elaboração dos filmes foram utilizados Isolado Proteico de Soro de Leite com 91% de proteína (WPI 9410), cedido pela *Hilmar Ingredients* (EUA), glicerol da Sigma-Aldrich (Brasil), nanopartículas de Montmorilonita (MMT) (Cloisite Na⁺) da *Southern Clay Products* (EUA) e metabissulfito de sódio da Labsynth (Brasil), além de ácido cítrico da Proquímios (Brasil). A formulação utilizada foi baseada no trabalho de Azevedo e colaboradores [13], com modificações. Um homogeneizado contendo 6g de IPS em 60 mL de água destilada foi obtido com o auxílio de agitador magnético a 500 rpm por 20 minutos. Em outro recipiente, 15 mL de água destilada foi homogeneizada com glicerol e MMT durante 15 minutos também em homogeneizador magnético a 500 rpm, conforme quantidade apresentada na Tabela 1. Em seguida as soluções foram unidas uma a outra em homogeneizador magnético a 750 rpm, durante 10 minutos. A solução resultante foi submetida a homogeneização ultrassônica (*Branson Digital Sonifier, Modelo 450*) por 10 minutos a potência de 80W/25°C e, subsequente aquecimento em banho Maria a 90°C/30 minutos. Após o aquecimento foi adicionada a quantidade de 21,4 mL de água destilada, seguido por ajuste de pH com solução de ácido cítrico 20% (p/v). Posteriormente foi adicionado 55,44 mg metabissulfito de sódio, diluído em 3,6 mL de água destilada, para que assim pudessem ser novamente levada ao homogeneizador ultrassônico por 5 minutos a potência de 80W/25°C.

Os filmes foram obtidos pelo método de “casting”, à temperatura ambiente. O controle da espessura dos filmes foi realizado pelo volume aplicado a um suporte circular de polipropileno com 13,2 cm de diâmetro, correspondente a 30 mL. As soluções filmogênicas foram então secas a

temperatura ambiente por até 24 horas para garantir a evaporação lenta do solvente e a formação do filme.

Todos os filmes foram armazenados por 48 horas antes das análises de permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência a tração (RT) e diâmetro de halo inibitório (DHI), sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($50 \pm 5\%$) controladas, conforme o método D618-00 [14].

O planejamento experimental foi repetido três vezes e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software SISVAR [15].

Tabela 1 Planejamento experimento para filmes.

FILME	Glicerol (mg/mg IPS)	Montmorilonita (mg/mg IPS)
1	0,37	0,01
2	0,37	0,03
3	0,41	0,01
4	0,41	0,03
5	0,37	0

Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A espessura média dos filmes foi mensurada pela leitura de 10 pontos distintos, escolhidos aleatoriamente em cada corpo de prova, usando um micrômetro digital. A PVA dos filmes foi determinada pelo método de acumulação de acordo com a ASTM E398-03 [16], com o equipamento Permatran W 1/50 G (Minneapolis, MN, USA) em modo de convergência de 3 ciclos. O equipamento foi calibrado com um filme de referência fornecido pelo fabricante e gás nitrogênio sob pressão de 200-300 kPa. Os testes foram realizados em triplicata e a PVA ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) foi calculada usando a Eq.1:

$$\text{PVA} = \text{TVA} \cdot \delta \cdot \Delta P^{-1} \text{ (Eq.1),}$$

Onde: TVA \rightarrow taxa de transmissão de vapor de água; δ \rightarrow espessura do filme; ΔP \rightarrow diferença de pressão de vapor entre as duas faces do filme: $\Delta P = S \cdot (R_1 - R_2)$; S \rightarrow pressão do vapor saturado à temperatura do teste (6.5537 kPa), R_1 \rightarrow umidade relativa do lado úmido (40%), R_2 \rightarrow umidade relativa do lado seco (10%).

Resistência a tração (RT)

A resistência à tração foi realizada em analisador de textura (Stable Microsystems, modelo TATX2i) conforme o método padrão D882-02 [17] com os seguintes parâmetros: célula de carga de 1kN e velocidade de $1,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Para cada filme, oito amostras de 10 mm x 100 mm foram analisadas. A RT foi calculada dividindo a carga máxima (pico do gráfico Força x Tempo) pela área da seção transversal do filme.

Diâmetro de halo inibitório (DHI)

A atividade antimicrobiana dos filmes foi avaliada cortando-se discos com 6,7 mm de diâmetro de cada filme, os quais foram fixados na superfície de meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) inoculado com *Salmonella* Enteritidis (2×10^7 UFC/placa) e incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação as zonas de inibição em torno de cada disco foram mensuradas com paquímetro, assim como a inibição no ponto de contato do disco com o meio [18].

Resultados e Discussão

Todos os filmes apresentaram atividade antimicrobiana nas condições testadas, não havendo diferença significativa entre as médias das amostras 1, 2, 3 e 5 (Tabela 2). JAY [19] relata que a ação bactericida dos sulfitos em microrganismos ocorre em concentrações acima de 0,2 mg/mL, o que corrobora com os resultados encontrados. Ainda segundo este autor, a teoria de que o SO_2 molecular

não dissociado é um dos responsáveis pela atividade antimicrobiana é sustentada pela alta eficiência desse composto em baixos valores de pH.

Pelos resultados obtidos na análise de variância, não houve diferença significativa entre os tratamentos 3 e 5 sendo estes os menores valores de permeabilidade. Entre os tratamentos com 0,37 mg glicerol/mg IPS o que obteve menor permeabilidade foi o tratamento 5, indicando que o MMT nesta concentração de glicerol, não reduziu a permeabilidade do filme de IPS em condições ácidas. Essa tendência também pode ser observada nos tratamentos com 0,41 mg glicerol/mg IPS (3 e 4), o que confirma a relação diretamente proporcional entre a quantidade de MMT e o valor de permeabilidade.

AZEVEDO e colaboradores [8] observaram uma tendência diferente; trabalhando com filmes biodegradáveis de IPS a 6% (p/v), 0,40 mg glicerol /mg de IPS, sem MMT e com 0,03 mg MMT/mg de IPS, verificaram que a adição do argilomineral reduziu pela metade a PVA comparada ao filme sem MMT. As diferenças observadas provavelmente se devem à mudança na metodologia de fabricação dos filmes. No presente trabalho, o filme de IPS foi acidificado, enquanto esses autores ajustaram o pH para 8,0. Sob condições ácidas, as moléculas de proteína nas soluções filmogênicas são parcialmente desdobradas devido à desnaturação da proteína e os seus grupos hidrofóbicos estão parcialmente expostos [20]. Além disso, os filmes confeccionados neste projeto tiveram a adição de MBS. Este composto, em solução aquosa, libera dióxido de enxofre (SO₂) que é convertido em bissulfito de sódio (NaHSO₃), um forte agente redutor. O NaHSO₃ pode estar competindo com o argilomineral na ligação à matriz proteica, o que impede a esfoliação do MMT no filme, resultando em aumento da PVA.

Tabela 1 Resultados médios para diferentes propriedades dos filmes.

FILMES	PVA (10 ⁻¹¹ g.m ⁻¹ .s ⁻¹ .Pa ⁻¹)	DHI (mm)	RT (MPa)
1	3,88 a	14,20 a	7,15 ad
2	4,38 b	15,13 a	6,57 a
3	3,57 c	14,30 a	4,61 b
4	4,73 d	12,67 b	5,37 c
5	3,60 c	14,90 a	7,76 d

* Médias seguidas de mesma letras, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. PVA – Permeabilidade ao vapor de água; DHI – Diâmetro de halo inibitório; RT – Resistência a tração.

A partir dos resultados observados na análise de RT, nota-se que os filmes com maior teor de glicerol (3 e 4) foram os menos resistentes a tração. O glicerol é um plastificante, e como tal, possui capacidade de reduzir as forças intermoleculares ao longo da cadeia dos polímeros, aumentando sua flexibilidade [21]. Pérez e colaboradores [22], trabalhando com concentrado proteico de soro e diferentes concentrações de glicerol e trealose verificaram que a incorporação do plastificante levou a redução da resistência a tração e do módulo de elasticidade. Efeito similar também foi observado por Bertuzzi e colaboradores [23] em filmes a base de amido de milho, nos quais o aumento da concentração de glicerol refletiu em redução da RT e aumento do alongamento.

Conclusões

Dentre as formulações testadas, o filme 5 (sem MMT e contendo 0,37 mg glicerol/mg IPS) apresentou menor permeabilidade ao vapor de água e maior resistência a tração, além de atividade antimicrobiana. Estas propriedades são indispensáveis na aplicação como embalagem ativa para alimentos, podendo ser objeto de estudo em pesquisas futuras.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro, e às Universidades Federais de Lavras (UFLA) e do Ceará (UFC).

Referências Bibliográficas

1. A. M. D. Villadiego; N. F. F. F. Soares; N. J. Andrade; R. Puschmann; V. P. R. Minim; R. Cruz. *Revista Ceres*. 2005, 53, 221- 244.
2. F. Devlieghere; A. Vermeulen; J. Debevere. *Food Microb.* 2004, 21, 703-714.
3. K. G. Zinoviadou; K. P. Koutsoumanis; C. G. Biliaderis. *Meat Science*. 2009, 82,338-345.
4. S. Mali; M. V. E. Grossamnn; M. A. García; M. M. Martino; N. E. Zaritzky. *Carbohydrate Polymers*. 2004, 56, 129-135.
5. S. J. Kim; Z. Ustunol. *J. Food Sci.* 2001, 66, 909-911.
6. T. Davanço; P. Tanada-Palmu; C. Grosso. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2007, 408-416.
7. M. Anker; J. Berntsen; A-M. Hermansson; M. Stading. *Innov. Food Sci. Emerg. Techn.* 2002, 3, 81-92.
8. V. M. Azevedo; E. K. Silva; C. F. G. Pereira; J. M. G. Costa; S. V. Borges. *Food Hydrocolloids*. 2015, 43, 252-258.
9. S. Tunç; O. Duman. *Appl. Clay Sci.* 2010, 48, 414-424.
10. J.G. Banks; R.G. Board. Comparison of methods for examination of free and bound sulphur dioxide in stored British fresh sausage. *J. Sci. Food Agriculture*, v. 33, p. 197 - 203, 1982.
11. S. Damodaran; K. L. Parkin; O. R. Fennema. *Química de Alimentos de Fennema*, Artmed, Porto Alegre, 2010, 900p.
12. R. A. Soares; N. M. Ladeira; E. M. C. Silva; R. H. Piccoli; S. V. Borges *in Anais do XXIV Congresso de Pós-Graduação da UFLA*, Lavras, 2015.
13. V. M. Azevedo; M. V. Dias; S. V. Borges; A; L. R. Costa; E. K. Silva; E. A. A. Medeiros; N. F. F. Soares. *Food hydrocolloids*. 2015, 48, 179-188.
14. American Society Standard Testing and Materials - ASTM. *Standard practice for conditioning plastics for testing*. ASTM D618-00. Philadelphia, EUA. 2000.
15. D. F. Ferreira. *Ciênc. Agrotec.* 2014, 38, 109-112.
16. American Society Standard Testing and Materials – ASTM. *Standard test method for water vapor transmission rate of sheet materials using dynamic relative humidity measurement*. ASTM E398-03. Philadelphia, EUA. 2003.
17. American Society Standard Testing and Materials – ASTM. *Standard test method for tensile properties of thin sheeting*, ASTM D882-02. Philadelphia, 2002.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standard – NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, M2-A8, 2003, 1-31.
19. J. M. Jay. *Microbiologia de Alimentos*. Artmed, Porto Alegre, 2005, 1-711.
20. P.Y. Hamaguchi; W. W. Yin; M. Tanaka. *Food Chemistry*. 2007, 100, 914 – 920.
21. V. M. Hernandez-Izquierdo; J. M. Krochta. *J. Food Sci.* 2008, 73, 30 - 39.
22. L. M. Pérez; G. N. Piccirilli; N. J. Delorenzi; R. A. Verdini. *Food hydrocolloids*. 2016, 56, 352 – 359.
23. M. A. Bertuzzi; J. C. Gottifredi; M. Armada. *Braz. J. Food Techn.* 2012, 15, 219-227.