

Propriedades tecnológicas e antimicrobiana de biofilmes de proteínas de peixe com óleo essencial de cravo

Wagner Barreto Silva¹, Consuelo Lúcia Lima Sousa¹, Cleidiane Silva Araujo¹, Victor Hugo Alves do Nascimento¹, Lúcia de Fátima Henriques Lourenço¹

¹ Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, PA, Brasil. E-mail: wagner@gmail.com (ORCID: 0000-0001-5435-892X); sousa@ufpa.br (ORCID: 0000-0001-9432-8637); cleidy_araujo@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0002-1043-8482); victor.itecufpa@gmail.com (ORCID: 0000-0003-2094-401X); luciahl@ufpa.br (ORCID: 0000-0001-5009-8235)

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antimicrobiana de biofilmes elaborados com proteínas de resíduos de filetagem de dourada (*Brachyplatysoma rousseauxii*) 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. 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 faecalis*. Os biofilmes de gelatina com OEC não inibiram o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras-chave: embalagem ativa; micro-organismos; resíduos indústrias

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 rousseauxii*) 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 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 faecalis*. The gelatin biofilms added of clove essential oil did not inhibit the growth of Gram positive and Gram negative bacteria.

Key words: active packaging; microorganisms; industry residues

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, β -cariofileno, α -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 rousseauxii*).

Material e Métodos

Foram utilizados resíduos (peles e aparas) oriundos do processo de filetagem de dourada (*Brachyplatysoma rousseauxii*), 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[®] Fragrâncias e Cosméticos Ltda.

Para a obtenção das proteínas miofibrilares da dourada utilizou-se metodologia proposta por Araújo et al. (2018). 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 centrifuga 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 Silveira et al. (2017) 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 (C₂H₄O₂) 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 (Isofar, Glicerina PA com 99,5% de pureza). A solução final foi homogeneizada (Turratéc -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 Silva et al. (2017) 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 por micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, modelo IP54) em seis locais aleatórios obedecendo a um afastamento da borda de 60 mm (Limpan et al., 2010). A cor foi determinada em triplicata, utilizando colorímetro MINOLTA modelo CR 310, obtendo-se parâmetros de L^* (luminosidade), a^* (intensidade do vermelho), b^* (intensidade do amarelo), C^* (valor do cromia), h^* (ângulo de tonalidade) e diferença total de cor (ΔE^*) e nos valores de Cromia (ΔC).

As propriedades mecânicas, resistência à tração (RT) e percentual de alongamento na ruptura (%E) dos biofilmes foram determinadas em oito corpos de provas 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⁻¹, 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 (m²) e a equação 2 ($E = dT/d_{inicial} \times 100$) onde: E = alongação (%); $d_{T=}$ distância total no momento da ruptura (mm); $d_{inicial}$ = 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, 1995) 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⁻² s⁻¹ Pa⁻¹); W = ganho de peso pelo dessecante (g); X = espessura do filme (mm); A = área da superfície do biofilme exposto (m²); t = tempo de incubação (hs); ΔP = 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 triplicatas de cada amostra 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 em triplicata (Gontard et al., 1994).

A microestrutura da superfície superior 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 et al., 2009; Santos et al., 2011). As cepas foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

A atividade antimicrobiana foi avaliada em triplicata 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 x10⁸ UFC mL⁻¹). 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 ≥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 = 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.

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 ($p < 0,05$) dos demais e a espessura influencia as propriedades tecnológicas dos biofilmes. Diversos valores de espessura para filmes biodegradáveis são relatados em pesquisas realizadas por Araújo et al. (2018); Vieira et al. (2018) e Silva et al. (2018).

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA) não apresentaram diferença entre os biofilmes e encontram-se próximos dos valores ($2,77$ a $5,34 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) 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 dos biofilmes produzidos neste trabalho diferiram entre si ($p < 0,05$), 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 ($p < 0,05$) entre os biofilmes expressando baixa saturação ou intensidade da cor. O valor do ângulo Hue (h) apresenta diferença ($p < 0,05$) 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.

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 ($p < 0,05$) 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

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 ^a ± 4,40	300,38 ^a ± 4,20	274,78 ^a ± 5,00	279,20 ^a ± 3,70
RT (Mpa)	10,1 ^a ± 0,90	2,65 ^b ± 0,10	3,37 ^b ± 0,50	2,7 ^b ± 0,10
Espessura (mm)	0,057 ^c ± 0,006	0,086 ^b ± 0,006	0,105 ^a ± 0,008	0,102 ^a ± 0,011
PVA ($10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)	5,8 ^a ± 2,61 $\times 10^{-12}$	5,13 ^a ± 5,96 $\times 10^{-12}$	4,16 ^a ± 1,39 $\times 10^{-11}$	4,53 ^a ± 3,72 $\times 10^{-12}$
Solubilidade (%)	45,74 ^d ± 0,10	52,79 ^b ± 1,38	65,04 ^a ± 0,20	50,0 ^c ± 0,10
Parâmetros de Cor				
L*	89,0 ^a ± 0,72	83,8 ^b ± 1,07	79,78 ^c ± 0,44	78,51 ^c ± 0,36
a*	-5,68 ^d ± 0,04	-3,98 ^c ± 0,35	-2,61 ^b ± 0,09	-1,84 ^a ± 0,10
b*	20,9 ^c ± 1,60	27,6 ^b ± 1,48	29,5 ^{ab} ± 0,16	31,52 ^a ± 0,11
C	21,4 ^c ± 1,24	27,9 ^b ± 1,42	29,7 ^{ab} ± 0,24	31,58 ^a ± 0,12
h	105,4 ^a ± 1,05	98,21 ^b ± 1,14	95,06 ^c ± 0,21	93,33 ^c ± 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%.

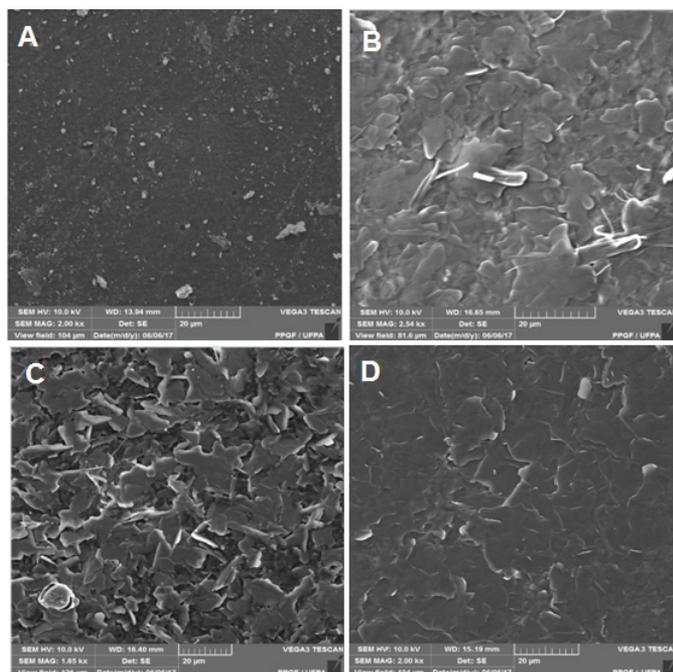


Figura 1. Microfotografias da superfície dos biofilmes de proteína miofibrilar com óleo essencial de cravo, com ampliação de $\cong 2.000 \times$. A (F1); B (F2); C (F3); D (F4).

componentes ao filme (Orliac et al., 2002; Shojaee-Aliabadi et al., 2013). 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.

Os valores de espessura e permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes não apresentaram diferença ($p \geq 0,05$) entre eles (Tabela 2). A PVA dos filmes contendo gelatina diminuiu com a adição de OEC, Tongnuanchan et al. (2013)

também relataram que o filme de gelatina de pele de tilápia contendo óleo essencial de raiz, de gengibre e cúrcuma, apresentou menores valores de PVA ao comparar com o filme controle. O valor PVA é afetado principalmente pela proporção hidrofóbica-hidrofílica dos constituintes do filme.

Houve diferença ($p < 0,05$) 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 verificaram 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 ($p < 0,05$) 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 ($p < 0,05$). O valor do ângulo Hue (h) apresenta diferença ($p < 0,05$) 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 obtidos para os biofilmes sem adição de óleo de cravo, indicaram que o filme elaborado com gelatina apresentou elevado percentual de alongação (434,87%), porém o de proteínas miofibrilares mostrou-se mais resistente (10,1MPa). Isto ocorre devido estas proteínas apresentarem grandes quantidades de grupos sulfidrílicos na superfície e maior número de pontes covalentes S-S na matriz do filme, formando filmes mais rígidos (Perez-Gago & Krochta (2001). As propriedades mecânicas devem ser suficientes para garantir a integridade dos filmes quando utilizados como embalagem, estando de acordo com os dados encontrados neste estudo. A permeabilidade ao vapor de água e a solubilidade foram melhores para os filmes de proteínas miofibrilares, pois segundo Yao et al. (2017), filmes

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 ^a \pm 3,04	443,46 ^a \pm 1,86	451,44 ^a \pm 0,13	447,97 ^a \pm 0,52
RT (Mpa)	6,54 ^a \pm 1,70	7,70 ^a \pm 1,80	2,61 ^b \pm 0,23	3,12 ^b \pm 0,90
Espessura (mm)	0,100 ^a \pm 0,01	0,124 ^a \pm 0,03	0,118 ^a \pm 0,03	0,134 ^a \pm 0,01
PVA ($10^{-11} \text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)	6,52 ^a \pm 6,51 $\times 10^{-12}$	5,90 ^a \pm 1,79 $\times 10^{-11}$	4,81 ^a \pm 9,22 $\times 10^{-12}$	1,02 ^a \pm 3,46 $\times 10^{-12}$
Solubilidade (%)	59,85 ^b \pm 2,06	42,17 ^c \pm 4,20	65,04 ^a \pm 3,33	50,08 ^b \pm 2,32
Parâmetros de Cor				
L^*	93,1 ^a \pm 0,53	90,3 ^b \pm 0,61	92,04 ^a \pm 0,47	89,34 ^b \pm 0,42
a^*	-5,5 ^b \pm 0,02	-5,27 ^a \pm 0,06	-5,9 ^c \pm 0,08	-6,0 ^c \pm 0,05
b^*	11,78 ^c \pm 0,66	17,3 ^b \pm 0,85	18,26 ^b \pm 1,7	25,87 ^a \pm 1,07
C	13,02 ^c \pm 0,6	18,16 ^b \pm 0,8	19,20 ^b \pm 1,71	26,56 ^a \pm 1,04
h	115,20 ^a \pm 1,2	106,9 ^b \pm 0,83	108,1 ^b \pm 1,52	103,04 ^c \pm 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%.

de gelatina apresentam alta solubilidade devido a presença de aminoácidos hidrofílicos, que se hidratam, se dissolvem, promovendo maior solubilização e absorção de água.

A cor dos biofilmes sem óleo essencial de cravo exibiram elevada luminosidade (L^*) sendo mais claros, parâmetro importante para a aplicação nos alimentos como embalagem. De maneira geral, os biofilmes elaborados com proteínas miofibrilares ou com gelatina de peixe sem adição de óleo, apresentaram excelentes propriedades físicas e de barreira, no entanto, ficou constatado que os biofilmes adicionados de OEC demonstraram possuir potencial industrial para o desenvolvimento de embalagens biodegradável, podendo auxiliar na extensão da vida útil de alimentos.

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

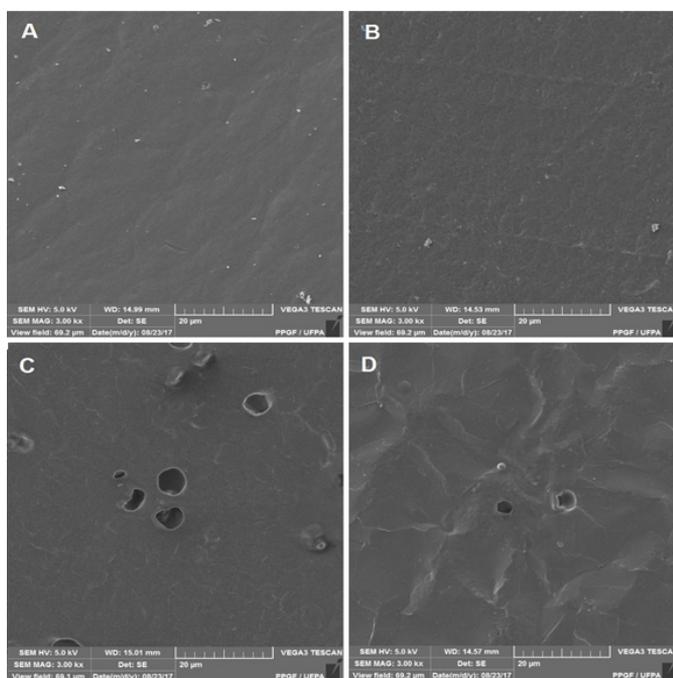


Figura 2. Microfotografias da superfície dos biofilmes de gelatina com adição de óleo essencial de cravo, com ampliação de 3.000 x: A (F1); B (F2); C (F3); D (F4).

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.

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 µg) e Vancomicina (30 µg), que foram utilizados como controles positivos (Tabela 3).

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; Lee et al., 2016).

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, β -cariofileno e α -humoleno) (Scherer et al., 2009), que podem afetar a capacidade dos compostos antimicrobianos.

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 µl)		14±0	16±0	20±0	13±0
Ampicilina** (10 µg)		15±0	16±0		
Vancomicina** (30 µg)				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 (10 µg) e Vancomicina (30 µg).

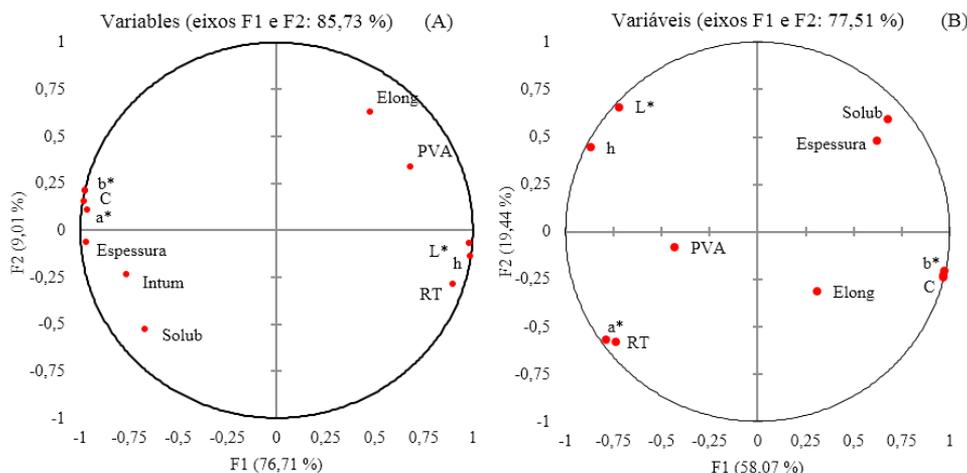


Figura 3. Projeção das medições de biofilme produzido com proteínas miofibrilares (A) e gelatina (B) no plano definido pelos dois primeiros componentes principais.

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 elongação. 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° são negativamente correlacionadas, enquanto que se elas estão separadas por 90°, 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), opostas 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 elongação e PVA tiveram grande influência para caracterizar o CP2, sendo negativamente correlacionada com b*, C, e a*, altamente correlacionadas entre si.

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 elongação, 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 elongação, 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 elongação, 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 elongação e cor clara.

Os biofilmes de proteínas miofibrilares apresentaram efeito inibitório nas concentrações utilizadas frente às bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, 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. Ao Laboratório Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas.

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, n.2, p.420-427, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.008>.

- American Society for Testing and Materials – ASTM. D882-91: Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: ASTM, 1996. (Annual Book of ASTM Standards).
- American Society for Testing and Materials – ASTM. E96-95: Designation standard method for water vapor transmission of materials. Philadelphia: ASTM, 1995. (Annual Book of ASTM Standards).
- Araújo, C.S.; Rodrigues, A.M.C.; Peixoto Joele, M.R.S.; Araújo, E.A.F.; Lourenço, L.F.H. Optimizing process parameters to obtain a bioplastic using proteins from fish byproducts through the response surface methodology. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 16, p. 23–30, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2018.01.009>.
- 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, n.7, p.84-91, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01294.x>.
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, n.3, p.223-253. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 19.ed. Wayne: CLSI, 2015. 73p. (CLSI Document, M02-A12).
- 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, n.2, p.90-98, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232013005000011>.
- Davanço T, Tanada-Palmu, P.; Grosso, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n.2, p. 408-416, 2007. <https://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, n.2, p. 374-381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- 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, n.7, p.889-896, 2010. <https://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, n.1, p.39-50, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb02045.x>.
- Kaiser, H. Directional statistical decisions. *Psychological Review*, v.67, n.3, p.160–167, 1960. <https://doi.org/10.1037/h0047595>.
- Lee, K. Y.; Lee, Ji - Hyeon; Yang, Hyun-Ju; Bin, C. K. Production and characterisation of skate skin gelatin films incorporated with thyme essential oil and their application in chicken tenderloin packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 6, p. 1465-1472, 2016. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13119>.
- 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, n.1, p.85-92, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.031>.
- Matta Junior, M.D.; Sarmento, 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, n.1, p.1- 6, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000011>.
- 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 Zootecia*, v.16, n.2, p.129-136, 2013. <https://doi.org/10.25110/arqvet.v16i2.2013.4499>.
- 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, n.20, p.5417–5425, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00434-2).
- Perez-Gago, M. B., Krochta, J. M. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, v. 66, n.5, p.705-710. 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04625.x>.
- 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, n.4, 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 Medicinais*, v.11, n.4, p.442-449, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 52, p. 116–124, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.026>.
- Silva, E.V.C.; Lourenço, L.F.H.; Pena, R.S. Optimization and characterization of gelatin from kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) skin. *CyTA - Journal of Food*, v. 15, n.3, p. 361-368, 2017. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1266391>.
- Silva, N. S., Pino Hernández, E. J. G., Araújo, C. S., Peixoto Joele, M. R. S.; Lourenço, L. F. H. Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. *CyTA – Journal of Food*, v. 16, n.1, p. 340-349, 2018. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1406005>.

- Silveira, G.P.; Nome, F.; Gesser, J.C.; Sá, M.M.; Terenzi, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p.844-855, 2006. <https://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, n.2, p.245-250, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200011>.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S.; Prodpran, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*. v. 117, n.3, p.350–360, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.005>.
- Turhan, K.N.; Sahbaz, F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methycellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, v.61, n.3, 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, n.4, p. 717-719. 2007. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400024>.
- Vieira, L. L.; Araújo, C.S.; Neves, E.M.X.; Batista, J.T.S.; Peixoto Joele, M.R.S.; Lourenço, L.F.H. Emulsified films produced with proteins extracted from corvin subproducts: development and characterization. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 44, n.3, e360, 2018. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2018.360>.
- Wolf, K.L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados com fibra e colágeno. São José Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2007. 103p. Dissertação Mestrado. <http://hdl.handle.net/11449/90777>. 29 Mar. 2018.
- Yao, Y.; Ding, D.; Shao, H.; Peng, Q.; Huang, Y. Antibacterial activity and physical properties of fish gelatin-chitosan edible films supplemented with D-Limonene. *International Journal of Polymer Science*. v. 2017, Article ID 1837171, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1837171>.
- 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, n.4, p.1973-1981, 2014. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12173>.