

MARIANA LELES LAMAS

**FILME DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE INCORPORADO COM ARGILA
MONTMORILONITA E NATAMICINA PARA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO
MUÇARELA FATIADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L213f
2015

Lamas, Mariana Leles, 1988-

Filme de proteína de soro de leite incorporado com argila montmorilonita e natamicina para conservação de queijo muçarela fatiado / Mariana Leles Lamas. – Viçosa, MG, 2015. vii, 61f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Embalagem. 2. Queijo muçarela - Conservação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.09

MARIANA LELES LAMAS

**FILME DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE INCORPORADO COM ARGILA
MONTMORILONITA E NATAMICINA PARA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO
MUÇARELA FATIADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de julho de 2015.

Ana Clarissa Dos Santos Pires
(Coorientadora)

Nélio José de Andrade
(coorientador)

Eber Antonio Alves Medeiros

Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

Aos meus pais, Creuza e Vitor,
Às minhas irmãs, Viviane e Ana Maria
Aos meus sobrinhos, Victor e Letícia
Ao meu namorado, Mateus,
Com amor,
Dedico!

AGRACEDIMENTOS

Primeiramente a Deus, por guiar todos os meus passos e mais esta vitória em minha vida.

Aos meus pais, Creusa e Vitor pelo amor, pela confiança, pelo incentivo, por acreditarem no meu potencial e por me ensinarem a honestidade, perseverança e a gratidão. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Viviane e Ana Maria, pelo amor, pela força e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sobrinhos, Leticia e Victor, pelos momentos de alegria e carinho.

Ao Mateus, uma pessoa muito especial em minha vida, pelo amor, pela compreensão, pelo incentivo, pela paciência de me ouvir e auxiliar em todos os momentos difíceis.

À minha orientadora, Nilda de Fatima Ferreira Soares, pela oportunidade, pela orientação, pela confiança, pela amizade, pelo apoio e pela dedicação a esse trabalho.

Aos meus coorientadores, Nélio e Ana Clarissa, pelos conselhos.

Ao professor Sukarno pela ajuda e apoio na realização das análises.

Aos companheiros do Labem, Daniela, Paula, Johana, Michelle, Allan e Eber pelo convívio amigável, pelos conselhos valiosos e a disponibilidade para ajudar.

Ao Cícero, Luciano pela grande ajuda, disponibilidade e apoio na realização de análises.

Aos estagiários e bolsistas, Laís, Ludmila, Carol, Gabriel, Pedro e Thiago, pela ajuda em todas as análises e pelos momentos de alegria e descontração.

À Miriane e Maria Adelaide, dois anjos que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, ajudando e apoiando em todos os momentos.

As empresas Alibra Ingredientes Ltda e Danisco Ltda pelo adoção do isolado proteico de soro e a natamicina.

Ao Conselho Nacional e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Mariana Leles Lamas, filha de Creusa Leles Milagres Lamas e Vitor Nadir Lamas, nasceu no dia 09 de maio de 1988 na cidade de Viçosa, Estado de Minas Gerais.

Em Março de 2009, ingressou no curso de Ciência Tecnologia de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se bacharel, em Ciência Tecnologia de Laticínios em 2013.

Em Agosto de 2013, iniciou o curso de mestrado em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, defendendo dissertação em julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO	1
EFEITO DA NATAMICINA E ARGILA MONTMORILONITA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FILME DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE	4
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4. CONCLUSÃO	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
EFEITO DE FILMES ATIVOS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE NA CONSERVAÇÃO DE MUÇARELA FATIADA	38
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4. CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
CONCLUSÃO GERAL.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

LAMAS, Mariana Leles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Filme de proteína de soro de leite incorporado com argila montmorilonita e natamicina para conservação de queijo muçarela fatiado.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Nélcio José de Andrade.

Filmes biodegradáveis são produzidos de materiais biológicos, portanto, de fácil decomposição por micro-organismos. Nestes filmes podem ser incorporados compostos ativos, obtendo a função de embalagem ativa. Neste trabalho, foi desenvolvida uma embalagem ativa de isolado protéico de soro de leite, nanopartículas de argila montmorilonita (MMT) e agente antifúngico natamicina (NAT). Na primeira etapa, os filmes foram desenvolvidos e caracterizados pela análise termogravimétrica (TGA), difração de raios X (DRX), propriedades mecânicas, propriedades ópticas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). A adição do MMT aumentou a estabilidade térmica dos filmes. Não foi observada nenhuma esfoliação do MMT. As características mecânicas e ópticas foram influenciadas pela adição de natamicina. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a formação de bolhas e cristais de NAT e MMT na superfície dos filmes. Houve interação entre o MMT e o biopolímero. Na segunda etapa, os filmes ativos foram avaliados quanto à espessura, à taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) e seu efeito ativo (antifúngico). A espessura do filme foi reduzida pela adição de NAT. Os valores de TPVA diminuíram devido a interação entre MMT e NAT, mas aumentaram quando os fatores foram adicionados isoladamente. A ação antifúngica da natamicina contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* e a microbiota endógena da muçarela foi observada pela formação de zonas de inibição no teste de difusão em ágar. Além disso, durante 12 dias de armazenamento a 4 ± 2 °C houve a redução de um ciclo log da microbiota endógena da muçarela fatiada. A utilização dos filmes ativos foram eficientes na conservação da muçarela fatiada, aumentando a vida de prateleira do produto

ABSTRACT

LAMAS, Mariana Leles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Whey protein film incorporated with natamycin and montmorillonite clay to mozzarella cheese slices for storage.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-Advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires and Nélío José de Andrade.

Biodegradable films are produced from biological materials, thus easily decomposed by microorganisms. In these films can be incorporated active compounds, obtaining the active packaging function. In this work, an active packaging composed of protein isolated whey, nanoparticles of montmorillonite clay (MMT) and antifungal agent natamycin (NAT) was developed. In the first stage, the films were developed and characterized by thermal gravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD), mechanical properties, optical properties, scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy (FTIR). The addition of MMT increased the thermal stability of the films. The exfoliation of the MMT was not observed. The mechanical and optical characteristics were influenced by the addition of natamycin. The SEM analysis revealed the formation of bubbles and crystals of NAT and MMT on the surface of the films. There was interaction between the MMT and the biopolymer. In the second stage, the active films were evaluated for thickness, water transmission rate (WVTR) and its active effect (antifungal). The thickness the film was reduced by adding of NAT. The WVTR values decreased due the interaction between MMT and NAT, but increased when the factores were added separately. The antifungal activity of natamycin against *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* and endogenous microflora of mozzarella was observed by the formation of zones of inhibition in the agar diffusion assay. Besides, there was a reducion of 1 cycle log of the endogenous microbiot of the mozzarella sliced stored for 12 days 4 ± 2 °C. The utilization of the actives films were efficients in the conservation of mozzarella sliced, increasing the produts shelf life.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis, a partir de recursos renováveis, apresenta-se como alternativa para a redução do impacto ambiental provocado pelos polímeros de fonte petroquímica, que causam grande impacto ambiental (DAVANÇO *et al.*, 2007; BARRETO, 2003; ROTTA, 2008). Os filmes biodegradáveis são filmes flexíveis, elaborados a partir de materiais biológicos como proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Estes filmes podem atuar como barreira à umidade, gases e compostos aromáticos, controlando a transferência de massa em sistemas alimentícios e mantendo a integridade estrutural. Permitem também a adição de aditivos ao filme como antioxidantes, aromas e agentes antimicrobianos, melhorando com isso a integridade do produto e, conseqüentemente, estendendo sua vida de prateleira (HERSHKO e NUSSINOVITCH, 1998; AZEREDO, 2003). Como são elaborados com materiais biológicos, uma das alternativas de produção é a utilização de proteínas de soro de leite.

O soro de leite é um coproduto resultante do processamento de queijo, constitui-se num excelente ingrediente para a fabricação de vários alimentos industrializados. As proteínas do soro de leite têm sido utilizadas em diversas aplicações alimentícias, devido às suas propriedades tecnofuncionais, tais como, a gelatinização, emulsificação, solubilidade, formação de espuma e viscosidade (FOEGEDING *et al.*, 2002; YOSHIDA e ANTUNES, 2009).

Filmes obtidos a partir de proteínas de soro de leite caracterizam-se pela transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para consumo (PORTA *et al.*, 2011; YOSHIDA e ANTUNES, 2009). No entanto, para tornar um biopolímero capaz de competir com os polímeros tradicionais, há necessidade de melhorar suas propriedades, incluindo a estabilidade térmica, propriedades mecânicas e propriedades de barreira (WANG *et al.*, 2005). Com isso, a nanotecnologia tem recebido grande atenção no desenvolvimento de embalagens de alimentos, que possibilita a aplicação de nanocompósitos e nanopartículas para melhoria dessas propriedades (COLLISTER, 2002; PATIL, 2005; RAY *et al.*, 2006).

Há várias nanopartículas inorgânicas reconhecidas como aditivos para melhorar o desempenho do polímero, e as mais utilizadas são as argilas e silicatos (SORRENTINO *et al.*, 2007). O tipo mais amplamente estudado de argila para

reforço de polímeros é a montmorilonita (MMT), composta por camadas de óxido de silicato e óxido de alumínio capazes de interagir com o polímero e melhorar as propriedades físicas e estruturais do mesmo (PAIVA *et al.*, 2006; LAGARON *et al.*, 2005; KOH *et al.*, 2008; LOTTI *et al.*, 2008). O filme com nanocompósito pode ser utilizado para armazenar queijos, como muçarela.

O consumo do queijo muçarela nos últimos anos cresceu significativamente, isso devido a mudança dos hábitos alimentares por alimentos tipo “fast food”, pizzas e alimentos congelados. A produção de queijo muçarela é feita com leite pasteurizado que garante a eliminação dos patógenos, no entanto há a contaminação pós produção que pode resultar na multiplicação de micro-organismos deterioradores durante o seu armazenamento (EVANGELISTA, 2013). Sendo assim, necessita de nova tecnologia, como a de embalagens ativas, que garantem um maior controle de contaminação microbiológica nos alimentos.

Atualmente, a utilização de compostos antimicrobianos ativos incorporados em material de embalagem vem recebendo mais atenção para o controle antimicrobiano no sistema de embalagem de alimentos, garantindo a segurança alimentar, podendo estender a vida de prateleira dos produtos (CHO *et al.*, 2011). O contato de compostos ativos com alimento tem a capacidade de mudar a sua composição ou a atmosfera, inibindo o crescimento de micro-organismos presentes na superfície do produto (ESPITIA *et al.*, 2012).

Antimicrobianos e antifúngicos, como nisina e natamicina, vêm sendo incorporados em polímeros para conservação de alimentos (SOARES *et al.*, 2009). São polímeros naturais incorporados com compostos ativos que despertaram interesse, pois, além de reduzir o impacto sobre o meio ambiente, proporciona, de maneira saudável e eficaz, qualidade aos alimentos (SUNG *et al.*, 2013; SADAKA *et al.*, 2014).

A liberação de aditivos por embalagens ativas aumenta a segurança do consumidor, já que esses compostos, ao invés de diretamente adicionados ao alimento, são liberados de maneira controlada. Com isso, estão presentes em menores quantidades, e apenas onde sua presença é requerida, ou seja, especialmente na superfície do produto, onde a maior parte das deteriorações ocorrem (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho desenvolver uma embalagem ativa de isolado protéico de soro de leite incorporada com natamicina e

nanopartículas de argila montmorilonita sódica (MMT- Na^+). Os objetivos específicos deste estudo foram (i) caracterizar a embalagem ativa quanto às propriedades mecânicas, ópticas e estruturais e (ii) avaliar a influência da natamicina no filme para inibição de leveduras e fungos filamentosos *in vitro* e em muçarela fatiada.

Capítulo 1

EFEITO DA NATAMICINA E ARGILA MONTMORILONITA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO FILME DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE

RESUMO

A utilização de substâncias ativas e de nanocompósitos são alternativas interessantes para preservação de alimentos e melhoria das características físicas das embalagens. Diante disso, foram estudados os efeitos do teor de argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT) sobre as propriedades térmicas, ópticas e mecânicas, no filme de isolado protéico de soro (IPS) produzido pelo método *casting*. A análise termogravimétrica revelou que a adição de MMT aumentou a estabilidade térmica dos nanocompósitos, porém a combinação com NAT reduziu essa estabilidade. O módulo de elasticidade e o alongamento diminuíram com adição de MMT. A resistência à tração não foi influenciada com a adição de MMT, mas diminuiu com adição do valor máximo de NAT. O alongamento na ruptura aumentou com adição das concentrações máximas de NAT e MMT e, consequentemente, houve redução do módulo de elasticidade, tornando os filmes menos rígidos e mais fracos. Os filmes contendo maior concentração de natamicina apresentaram-se mais opacos, sendo que os filmes com e sem MMT estavam mais transparentes, característica comum em filmes biodegradáveis. Todos os filmes obtiveram superfícies lisas, sem poros visíveis ou fissuras, flexíveis e homogêneos. As propriedades ópticas foram influenciadas com a adição natamicina. Foi possível observar na microscopia eletrônica de varredura cristais de NAT e MMT. Além disso, alguns filmes apresentaram em sua superfície a presença de bolhas, que podem influenciar nas propriedades mecânicas. Na análise de difração de raios-x não foi possível observar dispersão/esfoliação da MMT nas concentrações estudadas. A análise de espectroscopia no infravermelho apresentou interação entre NAT, MMT e IPS.

Palavras-chave: Nanocompósito, isolado protéico de soro de leite e natamicina.

1. INTRODUÇÃO

As embalagens derivadas de petróleo representam cerca de um quinto do volume do lixo urbano, não são constituídos por matérias biodegradáveis, criando problemas ambientais e produzindo quantidade considerável de resíduos. Uma alternativa para a redução de resíduos plásticos é a utilização de matérias-primas provenientes da agricultura e pecuária como o soro de leite. Devido ao fato de partirem de fontes renováveis e serem completamente biodegradáveis, podem agregar valor nutricional e melhorar características sensoriais quando consumidos junto com o produto ao qual forem aplicados, além de ser uma alternativa às matérias-primas derivadas do petróleo, reforçando a sustentabilidade do processamento (CARR, 2007; MAYACHIEW e DEVAHASTIN, 2010; PÉREZ-MATEOS *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2009).

Filme biodegradável tem como definição, camadas finas provenientes de materiais naturais, que podem ser aplicados como barreira entre o alimento e o ambiente. Dependendo da matéria-prima utilizada, estes filmes podem ser consumidos como parte do produto (KROCHTA *et al.*, 1997; SKURTYS *et al.*, 2009). Essas embalagens oferecem potencial para prolongar a vida de prateleira e melhorar a qualidade dos alimentos por meio do controle da transferência de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, sabor e aroma entre os componentes do alimento e atmosfera que os envolve (BALDWIN *et al.*, 2012).

O soro de leite é um coproduto em laticínios, resultante da coagulação da caseína, variando suas características de acordo com a qualidade do leite e de processamento (MARSHALL, 2004; SMITHERS, 2008). Filmes à base de proteínas são transparentes, homogêneos, flexíveis e de fácil manuseio. As propriedades funcionais dos filmes protéicos dependem das condições de obtenção dos filmes e também do estado estrutural inicial das proteínas (SOBRAL *et al.*, 2001; DENAVI *et al.*, 2008).

A forma mais pura das proteínas do soro de leite é o isolado protéico de soro (MULVIHILL *et al.*, 2003). Estudos com filmes à base de isolado protéico de soro de leite estão sendo feitos e avaliados devido às suas propriedades de resistência mecânica e de barreira ao oxigênio. Além disso, filmes à base de proteínas possuem natureza hidrofílica e apresentam baixa barreira à umidade. Entretanto, filmes biodegradáveis incorporados com nanocompósitos podem ter suas propriedades mecânicas e de barreira melhoradas (TUNÇ e DUMAN, 2010; WANG *et al.*, 2007).

A argila montmorilonita (MMT) é a argila mais utilizada em nanocompósitos de polímeros naturais. Pode ser usada como componente em embalagens para alimentos sendo um material de reforço, natural, não tóxico, químico e termicamente estável (RAO, 2007; TUNÇ e DUMAN, 2010). Por obterem estrutura lamelar e alta razão de aspecto, as nanoargilas podem aumentar a barreira física à difusão. Assim, uma melhoria significativa nas propriedades de barreira pode ser alcançada com a adição de quantidades relativamente pequenas de MMT (VARTIAINEN *et al.*, 2010). A argila montmorilonita sódica (MMT- Na^+), por ser hidrofílica, pode formar suspensões estáveis em água, o que facilita sua dispersão em polímeros solúveis como o isolado protéico de soro de leite.

Com o objetivo de inibir a ação de micro-organismos deterioradores e aumentar a vida útil de prateleira dos alimentos, compostos antimicrobianos, como a natamicina, são adicionados ao filme (CAGRI *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2007; NING *et al.*, 2009). A natamicina é um fungicida do grupo do macrólido polieno produzido por estirpes naturais de *Streptomyces natalensis* ou *Streptococcus lactis*. Este antimicrobiano era conhecido como pimarcina, age contra a multiplicação de fungos filamentosos e leveduras em produtos alimentícios, é considerado como Generally Recognized As Safe (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA), sendo considerado também como conservante natural pela União Europeia (FARID *et al.*, 2000; DELVES *et al.*, 2005; AMEFIA, *et al.*, 2006). A natamicina tem sido incorporada a vários biopolímeros como de celulose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2008), glúten de trigo e metilcelulose (TÜRE *et al.*, 2008), a quitosana (CE *et al.*, 2012; FAJARDO *et al.*, 2010), misturas de alginato e quitosana (DA SILVA *et al.*, 2012), a proteína de soro de leite (PINTADO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012), alginato e pectina (BIERHALZ *et al.*, 2012).

Objetivou-se com este trabalho desenvolver e caracterizar o filme a base de isolado protéico de soro de leite desenvolvido pelo método *casting* e avaliar o efeito da adição de natamicina (NAT) e nanopartículas de argila montmorilonita sódica (MMT- Na^+) quanto às propriedades mecânicas, ópticas e térmicas dos filmes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Isolado protéico de soro de leite (IPS 9400), com 90% de proteína, foi doado pela Alibra Ingredientes Ltda. Glicerol da Labsynth. A Natamicina (50%) “Natamax

natural antimicrobial” foi adoadada pela Danisco Ltda (Tabela 1 e 2). A argila montmorilonita sódica (Cloisite Na⁺) comercial Nanofil[®] foi fornecida pela Southern Clay Products e o hidróxido de sódio P.A Vetec Química Fina Ltda.

Tabela 1. Composição química do isolado proteico de soro

Composição	Quantidade (%)
Proteínas	90
Lipídeos	1,0
Lactose	1,0
Cinzas (sais minerais)	3,0

Tabela 2. Composição química da natamicina

Composição	Quantidade (%)
Natamicina (E235)	50
Lactose	50

2.2 Delineamento Experimental

Foi utilizado o delineamento composto central (DCC) com duas variáveis para estudar os efeitos combinados de nanopartículas de argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT) sobre as propriedades mecânicas e óticas dos filmes de isolado protéico de soro de leite (IPS) e avaliado pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O modelo estatístico que representa a influência do MMT e NAT sobre as propriedades mecânicas e óticas do filme foi desenvolvido e validado através da análise de variância (ANOVA).

Para melhores resultados no modelo de regressão, utilizou-se o procedimento de exclusão de variáveis “(stepwise)” a partir da análise da estatística t das variáveis, conforme realizado por Li (2012). Neste procedimento, todas as variáveis são incluídas no modelo e vão sendo retiradas uma a uma, em função da contribuição significativa dada pela análise da significância da estatística t. A técnica consiste em eliminar as variáveis não significativas, que correspondem àquelas que apresentam o menor valor da estatística t, em valor absoluto, por se tratar das variáveis de menor importância (HAIR Jr *et al.*, 2009). Para as variáveis significativas, procedeu-se a análise de correlação para quantificar o grau de correlação com a variável

resposta. As análises de microscopia, calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica e difração de raio-x foram submetidos à análise descritiva.

2.3 Desenvolvimento dos filmes

Os filmes de isolado protéico de soro de leite (IPS) foram desenvolvidos segundo Azevedo 2013 e Azevedo 2015 com modificações, sendo IPS e glicerol fixados em 6% (m/v) e 40 % (m/v), respectivamente, baseado em pré-testes. O filme IPS foi preparado dissolvendo-se 7,5 g (m/v) de IPS com 2,4 g de glicerol (GLI) (baseado na massa de IPS) em 55 mL e 70 mL de água deionizada respectivamente, sendo ambos separadamente submetidos à agitação contínua em agitador magnético durante 20 min, em temperatura ambiente. Os demais filmes foram desenvolvidos conforme filme IPS, variando a MMT (1 e 3 g/100 g de IPS) e NAT (2 e 5 g/100 g de IPS) dispersos com glicerol. Após agitação, as soluções foram vertidas uma na outra e manteve-se agitação contínua durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o pH foi ajustado para 8 com NaOH 2M e levado em banho ultrassônico em 25 °C/10 min/80 W. Posteriormente, as soluções foram aquecidas a 90 °C por 30 minutos em banho-maria, resfriada à temperatura ambiente e vertidas em placas de vidro. O controle de espessura foi efetuado por volume aplicado no suporte, correspondente a 125 mL. Em seguida, os filmes com dimensões 18 x 30 cm, foram secos em temperatura ambiente durante 48 h garantindo evaporação lenta do solvente e formação do filme. Os tratamentos estão decritos na Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos dos filmes de isoalado protéico de soro incorporado com argila montmorilonita sódica e natamicina.

Tratamentos	Concentrações*
A	MMT0%NAT0%
B	MMT0%NAT2%
C	MMT0%NAT5%
D	MMT1%NAT0%
E	MMT3%NAT0%
F	MMT1%NAT2%
G	MMT1%NAT5%
H	MMT3%NAT5%
I	MMT3%NAT5%

*Argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

2.4 Termogravimetria (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas com auxílio de um analisador térmico DTG (Shimadzu, mod. 60), onde cerca de 2 mg de amostra do nanocompósitos foram aquecidos na faixa de temperatura de 25 °C a 800 °C com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ para cada amostra. A vazão de nitrogênio foi mantida em 60 cm³. min⁻¹ (CHANG *et al.*, 2010).

2.5 Difração de Raio X (DRX)

As análises de difração de raios-x nos nanocompósitos foram realizadas no laboratório de nanotecnologia no departamento de Física da universidade Federal de Viçosa (Shimadzu, XRD-6000) usando um cristal de grafite como monocromador com radiação de filtro de Cu-k_{α1} ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). As amostras foram fixadas em suporte de alumínio e analisadas com um passo de 0.02° s⁻¹, 2 θ de 1°- 15°, velocidade 1° min⁻¹ e 30 kV, 30 mA. O espaçamento basal (d) nos compósitos foi calculado pela equação de Bragg (Equação 1):

$$\sin \theta = \lambda / 2d \quad \text{eq. (1)}$$

Onde: λ corresponde ao comprimento de onda utilizado (1.5406 Å) para gerar a radiação no equipamento; d é a distância que se deseja calcular entre as lamelas da argila; θ é o ângulo onde se detecta o pico no difratograma.

2.6 Propriedades Mecânicas

Os filmes produzidos foram submetidos a testes mecânicos para avaliação da resistência à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo elástico (MPa) de acordo com a norma ASTM D882–91 (ASTM, 2002), utilizando-se a Máquina Universal de Testes Mecânicos (INSTRON Corporation, modelo 3367). Foram testados 5 corpos de prova de cada tratamento com cinco repetições no ponto central, com dimensões de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A máquina foi operada com carga de 1 kN, velocidade de separação das garras de 12,5 mm.min⁻¹ e distância inicial de 50 mm (ASTM, 2002).

2.7 Propriedades ópticas

A cor dos filmes foi medida usando o colorímetro Color Quest XE, Hunter Lab (Reston, VA, USA) e sistema CIE (L^* , a^* , b^*) com fonte de luz D65, ângulo observador de 10° e modo refletância. Os parâmetros analisados foram: Luminosidade (L^*), tendência a cor verde (a^*), tendência a cor amarela (b^*), Opacidade (OP), índice de branco (WI) e índice de amarelo (YI).

Os resultados foram expressos como a média de duas leituras. A transparência dos filmes foi determinada medindo a transmitância (%) a 600 nm usando o espectrofotômetro (Shimadzu, GBC UV/VIS 918) conforme método D1746-03 (ASTM, 2003a). A transparência (T_{600}) foi calculada pela equação 2.

$$T_{600} = (\text{Log } \% T) / \delta \quad \text{eq. (2)}$$

onde δ é a espessura do filme (mm).

2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microscopias da superfície dos filmes foram realizadas com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (Model TM3000, Hitachi High-Tech) com aumentos de 1000 X e 5000 X, no Laboratório de Embalagem do Departamento de Engenharia de alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para avaliar os diferentes tipos de estruturas formadas na superfície dos nanocompósitos. Foram preparadas amostras de $0,5 \text{ cm}^2$ de cada filme. Em seguida, foram fixadas em stubs cobertas com uma camada de carbono (entre 20 e 30 nm) com auxílio de uma pinça (CAMILLOTO, 2009).

2.9 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) foi realizada com o objetivo de identificar as interações entre a matriz polimérica (proteína do soro de leite) a argila e Natamicina adicionados. Os nanocompósitos foram fixados no equipamento FT-IR (Thermo Scientific, Nicolet

6700). Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em ampla região de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho é aplicada para a determinação das características da matriz polimérica e alterações de interações intermoleculares dos nanocompósitos (ZHONG *et al.*, 2011). Ao ocorrer mistura dos compostos, resulta em interações químicas e ligações físicas que refletem mudanças nos picos espectrais (MARTINS *et al.*, 2012)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aparência dos filmes de isolado protéico de soro

Os filmes contendo maior concentração de natamicina (C) MMT0%NAT5%; (G) MMT1%NAT5%; (I) MMT3%NAT5%, apresentaram-se mais opacos, sendo que os filmes com e sem MMT apresentaram-se transparentes. Entretanto, todos os filmes obtiveram superfícies lisas, sem poros ou fissuras, flexíveis e homogêneos (Figura 1). Os dois lados dos filmes possuíam aparência diferente, o lado do filme voltado para a placa de vidro apresentou-se com aspecto brilhante, enquanto o outro lado era opaco. Ramos *et al.* (2012) explicam que essa diferença na aparência é provavelmente ligada a agregação das partículas que ocorre na solução durante a secagem. Resultados semelhantes quanto a aparência dos filmes de proteínas de soro de leite também foram encontrados por Mchugh e Krochta (1994), Fernández *et al.* (2007) e Azevedo (2015).

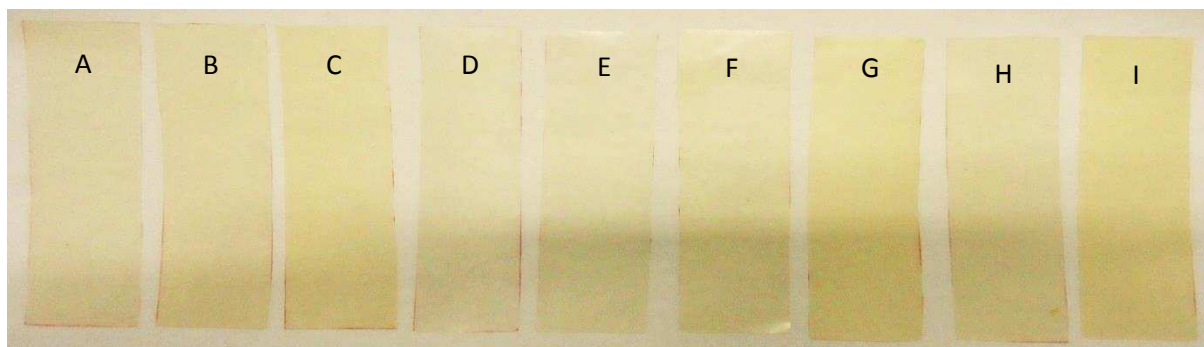


Figura 1. Filmes de isolado protéico de soro de leite incorporado com concentrações de natamicina e argila motmorilonita. (A) MMT0%NAT0%; (B) MMT0%NAT2%; (C) MMT0%NAT5%; (D) MMT1%NAT5%; (E) MMT3%NAT0%; (F) MMT1%NAT2%; (G) MMT1%NAT5%; (H) MMT3%NAT5%; (I) MMT3%NAT5%.

3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

Para determinar a estabilidade térmica dos nanocompósitos de isolado protéico de soro de leite com MMT e NAT foi realizada a análise termogravimétrica

(TGA) e derivada termogravimétrica (DTG). As medidas de estabilidade térmica dos compostos em pó e dos filmes estão representados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Estabilidade térmica dos componentes em pó IPS/MMT/NAT.

Composto	Ti(°C) ^a	DTG _{max} (°C)	Tf(°C)	Perda de massa (%)	Res (%) 800 °C
IPS (pó)	170,68	322,41	465,52	52,03	16,26
MMTNa ⁺ (pó)	464,65	607,96	679,53	67,37	87,93
NAT (pó)	158,82	304,41	505,51	67,37	20,52

Tabela 2. Estabilidade térmica dos filmes de IPS/MMT/NAT.

Tratamento	Ti(°C) ^a	DTG _{max} (°C)	Tf(°C)	P. de massa (%)	Res (%) 800 °C
A	144,64	310,76	576,34	73,98	11,38
B	131,88	321,65	497,55	66,19	6,94
C	118,74	323,34	468,82	71,58	13,19
D	132,32	314,71	680,58	87,93	3,51
E	126,31	318,1	506,88	65,92	14,34
F	113,45	319,16	461,85	71,50	14,49
G	134,49	318,27	535,74	69,65	11,44
H	121,23	318,66	459,41	67,32	14,85
I	129,15	277,27	654,03	86,14	1,980

^aTi (temperatura inicial de decomposição); DTG_{max} (temperatura máxima de decomposição); Tf(temperatura final de decomposição); P. de massa (porcentagem da perda de peso na decomposição); Res800°C (porcentagem de resíduo até 800°C).

A curva de composição térmica no primeiro estágio foi observada em aproximadamente 25 a 200 °C para todos os filmes, devido à perda de moléculas de água e materiais voláteis (MA *et al.*, 2005; NUTHONG *et al.*, 2009; SU *et al.*, 2010; GONZÁLEZ e IGARZABAL, 2013). Na faixa de temperatura de 200 a 500°C houve elevada perda de massa, resultando no segundo estágio de decomposição, que corresponde à degradação das proteínas presentes no soro que são α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glicomacropéptídeos, além do plastificante incorporado na matriz do filme (Figura 2). Resultado semelhante foi encontrado em filme de soro de leite e de outras proteínas, como caseinato de sódio e gelatina (BARRETO *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2015).

As curvas são representadas na Figura 2. Podem-se observar 3 estágios de degradação dos filmes na faixa de 25 °C a 800 °C.

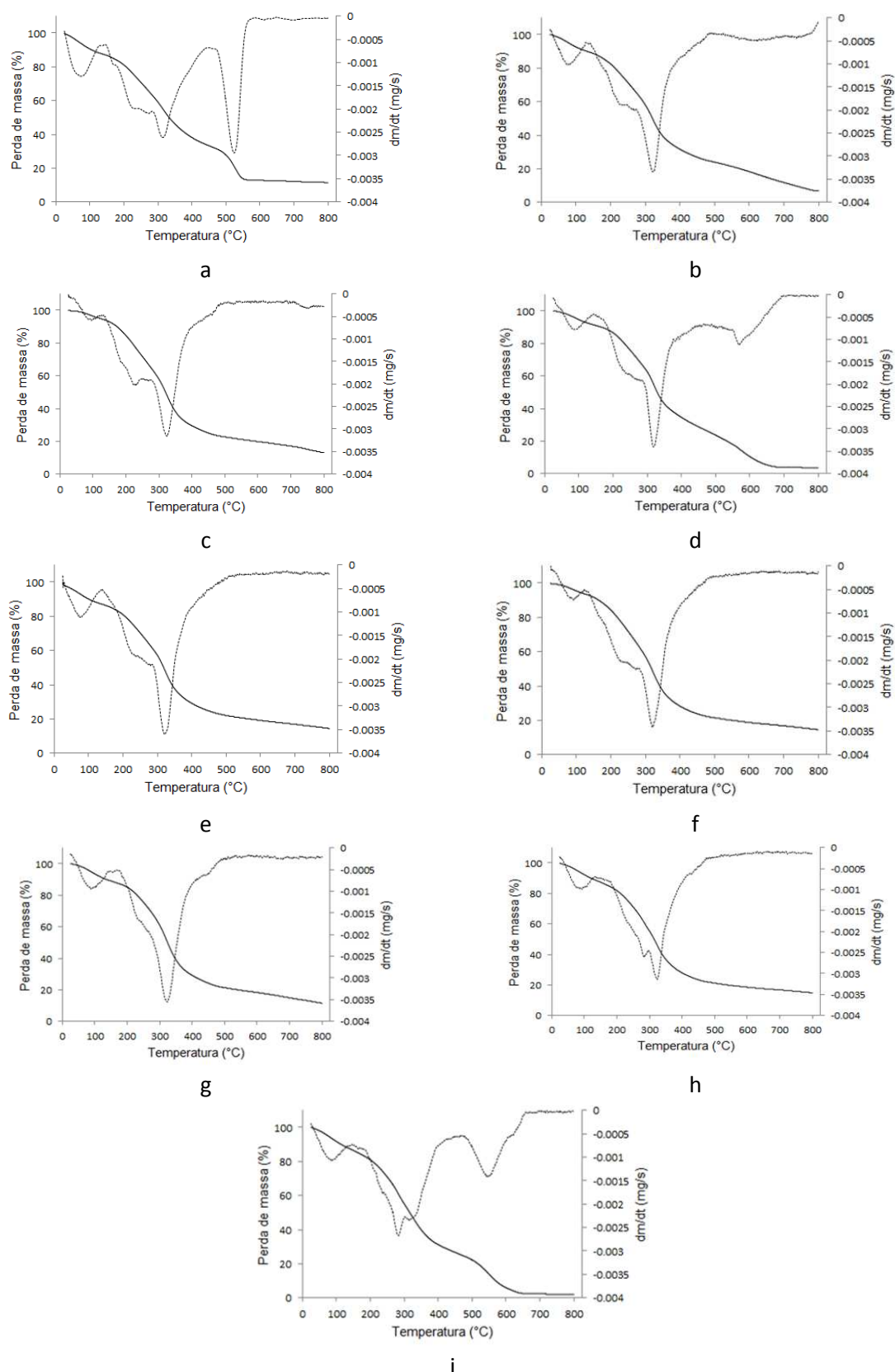


Figura 2. Curva de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) dos filmes de isolado protéico de soro, incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT). (a) MMT0%NAT0%; (b) MMT0%NAT2%; (c) MMT0%NAT5%; (d) MMT1%NAT0%; (e) MMT3%NAT0%; (f) MMT1%NAT2%; (g) MMT1%NAT5%; (h) MMT3%NAT2%; (i) MMT3%NAT5%.

A curva referente à faixa de 500 a 800 °C é devido a decomposição formada segundo Canevarolo Junior (2003) e à degradação oxidativa de resíduos de carbono formados durante o primeiro e segundo estágio, essa decomposição ficou mais acentuada no filme A (MMT0%NAT0%). O material carbonáceo formado no terceiro estágio não é decomposto em atmosfera de nitrogênio. No entanto, sob atmosfera de ar ocorre a oxidação completa e a perda de massa é de 100%.

Os filmes C (MMT0%NAT5%), H (MMT3%NAT2%) e I (MMT3%NAT5%), apresentaram uma reação secundária na faixa aproximadamente de 160 a 300 °C (Figura 2c, h e i), resultante de uma possível degradação do isolado protéico de soro com natamicina. Cerqueira *et al.* (2013) na análise termogravimétrica de filmes a base de polissacáridos incorporados com natamicina, mostraram que nas faixas de 215 a 225 °C e 260 a 270 °C, ocorreu desidratação, despolimerização e decomposição do esqueleto de polissacárido. Ramos *et al.* (2013) estudaram filmes de IPS e CPS com diferentes concentrações de glicerol, observaram que houve perda de massa acentuada entre 280 e 500 °C. Essa perda está associada com a degradação da proteína e com o plastificante glicerol, incorporado na matriz do filme.

Os filmes D (MMT1%NAT0%) e I (MMT3%NAT5%) apresentaram acentuada decomposição aproximadamente na faixa de 500 a 700 °C (Figura 2a, d e i). Zanetti *et al.* (2001) relatam que a fração inorgânica da argila se decompõe acima de 500 °C, isso provavelmente devido a adsorção dos produtos de degradação à superfície dos silicatos, que estão dispersas no nanocompósitos. A desidroxilação de OH da argila ocorre na faixa de temperatura de 556-636,4 °C (Xi *et al.*, 2004). Ning *et al.* (2009) obtiveram melhorias na estabilidade térmica dos nanocompósitos de amido termoplástico e MMT. Wang *et al.* (2009) atribuíram o aumento da estabilidade térmica dos nanocompósitos de amido termoplástico extrusados com a adição de MMT devido à intercalação e esfoliação, que promove uma estrutura com uma barreira física na matriz, dificultando a passagem de gases e líquidos. Assim como, o filme desenvolvido em nosso trabalho, que promoveu aumento na estabilidade térmica nos filmes de isolado protéico de soro incorporados com MMT e NAT.

3.3 Difração de Raio X (DRX)

Para explicar o efeito da adição da MMT nas propriedades mecânicas dos filmes, a análise de difração de raio-x foi realizada para determinar o espaço entre as lamelas de nanoargila e a matriz polimérica. A Figura 3 representa os padrões de

difração de raios-x de isolado protéico de soro de leite (IPS), argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

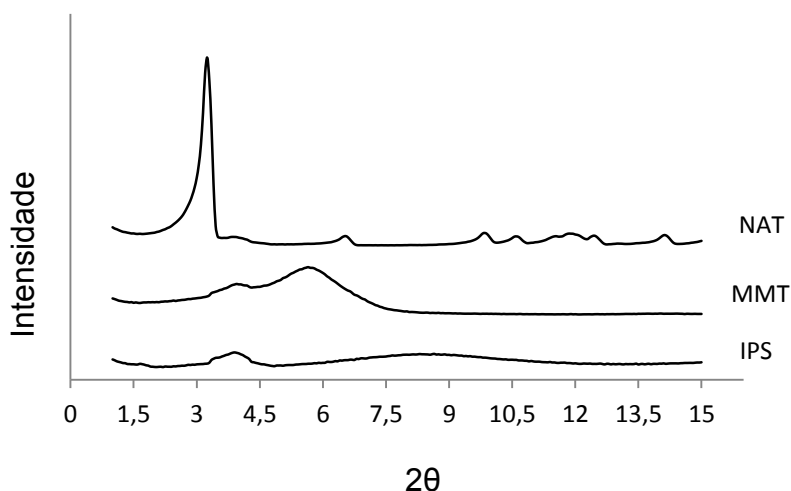


Figura 3. Difração de raio-x (DRX) de IPS: isolado protéico de soro de leite em pó; MMT: argila montmorilonita; NAT: natamicina.

Na Figura 3 não foi possível observar picos que poderiam indicar a presença de cristais de lactose no IPS. Fato semelhante foi observado no trabalho de Azevedo *et al* (2015). Segundo Nijdam *et al.* (2007) a lactose transforma-se em um estado amorfo devido ao processo de secagem do soro de leite líquido. A formação do pico de MMT não se apresentou muito acentuado em $2\theta = 6,05^\circ$; e espaçamento entre as lamelas foi de $d_{001} = 14,13 \text{ \AA}$. Na literatura, o espaçamento mínimo d_{001} entre as lamelas de argila montmorilonita sódica completamente seca é de cerca de $10 \text{ \AA}$, ou seja, $1,00 \text{ nm}$ ou em torno de $1,2$ a $1,4 \text{ nm}$ (FORNES e PAUL, 2003; POZSGAY, 2003). A natamicina apresentou um pico elevado que foi detectado em $2\theta = 3,15^\circ$; $d = 28,03$.

A presença do pico em torno de $2\theta = 3,4^\circ$ está em todos os tratamentos, não evidenciando a formação do pico de MMT e não verificando a intercalação ou esfoliação do mesmo, como era esperado (Figura 4).

AOUADA *et al.* (2011) em filmes de amido foi possível estudaram o efeito de diferentes concentrações de MMT e observaram uma esfoliação nas lamelas de argila com concentrações de 1 e 2%, e não obtiveram um grau de esfoliação eficiente a partir de 3% de MMT na matriz do amido e afirmam que os picos de difração podem ser causados pelo teor elevado de argila o que poderia levar a formação de agregados de MMT.

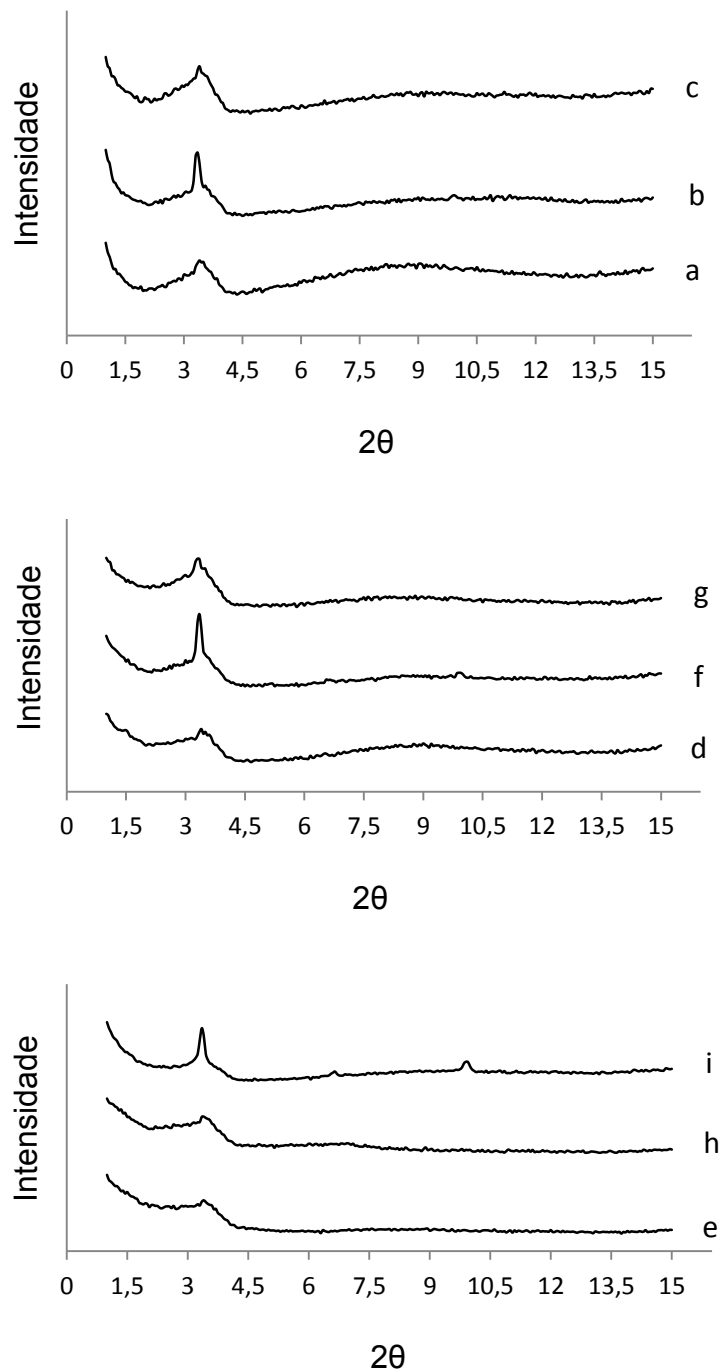


Figura 4. Difração de raio X (DRX) dos filmes de isolado protéico de soro incorporado com argila montmorilonita e natamicina. (a) 0%MMT0%NAT; (b) 0%MMT2%NAT; (c) 0%MMT5%NAT; (d) 1%MMT0%NAT; (e) 3%MMT0%NAT; (f) 1%MMT2%NAT; (g) 1%MMT5%NAT; (h) 3%MMT2%NAT; (i) 3%MMT5%NAT.

De acordo com Chivrac *et al.* (2008), o grau de agregação da argila depende da intensidade do pico para ser alto ou baixo. No entanto, picos mais estreitos de maior intensidade foram observados nos tratamentos D (MMT0%NAT5%), F (MMT1%NAT2%) e I (MMT3%NAT5%), sendo possível cristalinidade devido ao isolado protéico de soro ou natamicina. Para observar uma possível intercalação ou

esfoliação da argila montmorilonita é necessário que se conclua com microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.4 Propriedades ópticas

O estudo das propriedades ópticas foram realizadas para observar o efeito da argila montmorilonita e natamicina na transparência dos filmes desenvolvidos. A análise estatística mostrou que o modelo de regressão para a tendência a cor verde (a^*), tendência a cor amarela (b^*), índice de amarelecimento (YI) e porcentagem de transmitância apresentaram diferenças significativas entre os filmes (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de DCC, na avaliação das propriedades ópticas do filme de isolado de soro protéico com concentrações de NAT e MMT.

Parâmetros	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
/ T ₆₀₀	374,4* + 29,1* NAT - 16,07* NAT ²	0,8038	0,7830
L*	MÉDIA = 89,098	-	-
a*	-1,2719* - 0,0942 NAT - 0,0798* MMT + 0,02196* NAT ²	0,6284	0,06050
b*	5,112* + 2,988* NAT - 0,2130* NAT ²	0,9361	0,8810
OP	11,046* + 0,749* NAT	0,7378	0,0880
WI	49,03* - 10,43* NAT	0,9048	0,2930
YI	8,867* + 5,603* NAT - 0,398* NAT ²	0,9457	0,8910

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

O parâmetro luminosidade (L^*) não apresentou nenhuma significância, obtendo uma média de 89,098 entre os tratamentos estudados. Esse resultado pode ser atribuído à baixa concentração de MMT presente nos filmes não sendo suficiente para redução da luminosidade. A adição de natamicina não influenciou neste parâmetro estudado. No trabalho de Sothornvit *et al.* (2009) houve a diminuição do valor L^* , esse resultado pode ser devido à propriedade hidrofílica do MMT e a sua compatibilidade com biopolímero hidrofílicos de proteínas de soro de leite.

O parâmetro (a^*) não foi influenciado pela adição de MMT nas concentrações estudadas, isto foi provavelmente devido a cor que esse parâmetro representa que é a tendência ao verde, quando os valores obtidos são negativos, ou vermelho, quando valores são positivos. Hong e Rhim (2008) relataram que pode haver

aumento no parâmetro a^* quando há incompleta dispersão da MMT em um polímero hidrofílico, como o filme de isolado protéico de soro. No entanto, a adição de natamicina aumentou a^* no filme de IPS desenvolvido, o menor valor de a^* foi obtido com 2,14% de natamicina, (Figura 5a). A adição de glicerol no filme desenvolvido não interferiu neste parâmetro. Resultado semelhante aconteceu em filmes de amido, em que a adição de glicerol não alterou o parâmetro a^* (OLLÉ RESA *et al.*, 2014).

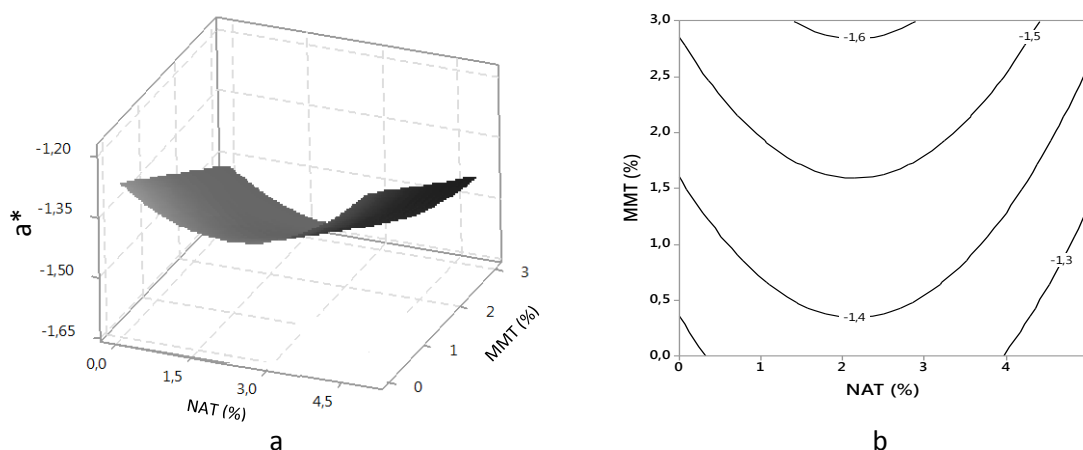


Figura 5. Superfície de resposta do parâmetro de tendência ao verde (a^*) dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

O parâmetro de tendência a cor amarela (b^*) foi influenciado pelo efeito linear de natamicina ($p > 0,05$), enquanto que a adição de nanopartículas de argila montmorilonita nas concentrações testadas não obteve efeito sobre esse parâmetro. O coeficiente de regressão linear de natamicina foi positivo, indicando que, os valores positivos deste parâmetro indicam uma tendência na direção amarela e valores negativos indicam uma tendência na direção azul. No entanto, o efeito negativo quadrático de NAT indicou que b^* aumentou até certa concentração de NAT, e depois de chegar a essa concentração crítica, esse parâmetro diminuiu de forma quadrática (Figura 6). Os maiores valores de b^* foram obtidos com os maiores valores de natamicina nos intervalos estudados. Este efeito foi devido a cor natural da natamicina que proporcionou maior tendência a cor amarela. Esse fenômeno foi observado também no trabalho de Ollé Resa *et al.* (2014) que obtiveram maior medida de b^* pela adição conjunta de natamicina e de nisina. No entanto, a adição de natamicina pura produziu menor alteração neste parâmetro quando em comparação ao filme controle.

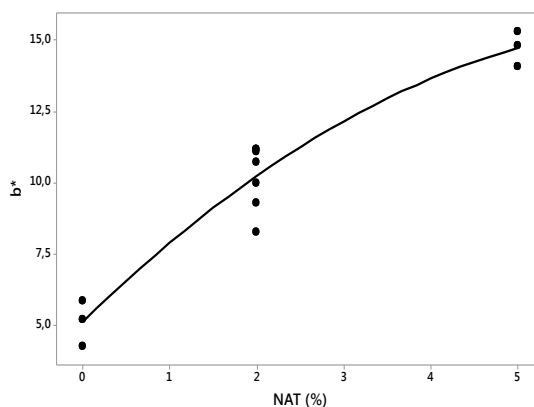


Figura 6. Resposta quadrática do parâmetro de tendência a cor amarela (b^*) dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

Os valores de opacidade (OP) foram influenciados pelo efeito linear da natamicina que aumentou à medida que os valores de natamicina aumentaram (Figura 7). A adição de MMT nos níveis estudados não interferiu na opacidade. No trabalho de Bierhalz *et al.* (2012) a incorporação de natamicina em filmes de alginato, resultou no aumento da opacidade de todos tratamentos. Isto pode estar relacionado com o efeito surfactante da natamicina, uma vez que a estrutura química da molécula contém uma parte hidrofóbica. Yang e Paulson (2000) observaram um aumento na opacidade do filme de gelatina devido à adição de substâncias hidrofóbicas. Este comportamento pode ser provocado por diferenças na espessura e no grau de reticulação. De acordo com Yang *et al.* (2010) filmes com grau de reticulação mais elevado tendem a apresentar aumento na opacidade devido a diminuição no espaçamento inter-cadeia do polímero, permitindo que haja menos passagem de luz através do filme.

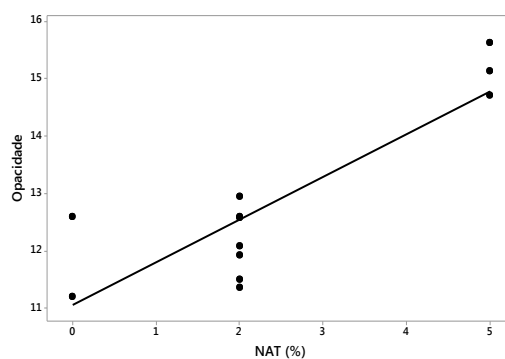


Figura 7. Retas referentes à opacidade dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

A adição de natamicina interferiu no índice de branco (WI), sendo que os valores do WI diminuíram à medida que os valores de NAT aumentaram, indicando que as altas concentrações de NAT resultam em valores mais baixos de WI no filme

desenvolvido (Figura 8a). Em filmes nanocompósitos adicionado com pediocina observou-se a redução do índice de branco WI, essa redução pode estar relacionada a cor da pediocina e natamicina que ambos em forma de pó apresentam cor amarelada (ESPITIA *et al.*, 2013).

O parâmetro de índice de amarelo (YI) foi influenciado pelo efeito linear de natamicina ($p>0,05$), enquanto a adição de MMT nas concentrações testadas não obteve efeito sobre esse parâmetro, indicando que os maiores valores do YI foram obtidos com maiores valores de natamicina. No entanto, o efeito negativo quadrático de NAT indicou que YI aumentou até certa concentração de NAT, e depois de chegar a essa concentração crítica esse parâmetro diminuiu de forma quadrática (Figura 8b), devido a agregação de fases das partículas. No trabalho de Espitia *et al.* (2013) nos filmes ativos de hidroxipropilmetilcelulose, o índice de amarelecimento (YI) foi afetado pela adição de pediocina, uma vez que este antimicrobiano em forma de pó apresenta naturalmente cor amarela assim como a natamicina adicionado nos filmes de IPS desenvolvidos. Este resultado também foi observado nos filmes de fécula de mandioca e hidroxipropilmetilcelulose incorporados com nisina, que resultou em aumento de valores de YI em relação ao filme controle (BASCH *et al.*, 2012). Os autores atribuíram a tendência amarelada dos filmes para a cor própria da nisina. Assim, com base nos resultados e trabalhos relacionados, a presença de natamicina nas formulações dos filmes desenvolvidos obteve uma cor ligeiramente amarelados.

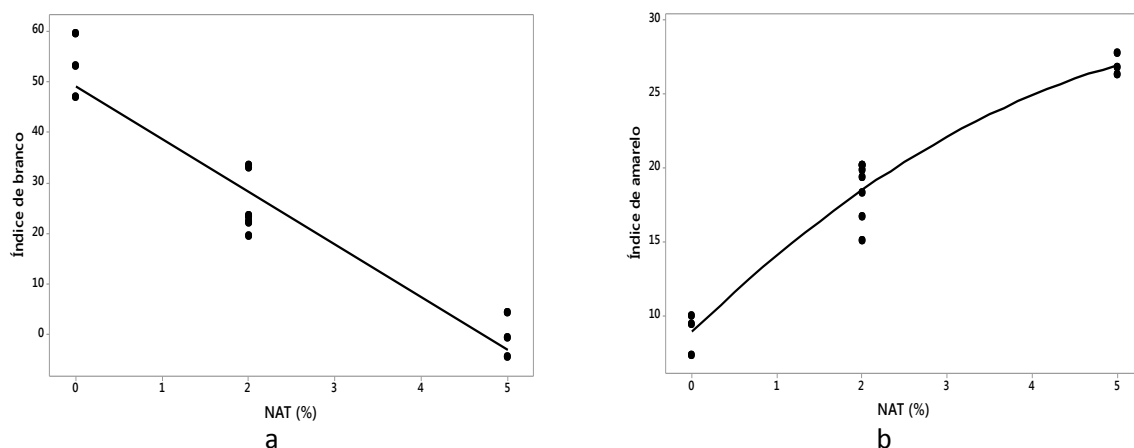


Figura 8. (a) e (b) Reta e resposta quadrática referente ao índice de branco e ao índice de amarelo, respectivamente, dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

O maior valor de porcentagem de transmitância foi obtido com 0,91% de natamicina, os valores de MMT (0, 1 e 3%) estudados não afetaram a transparência

do filme. A transmitância do filme foi influenciada pelo efeito linear de natamicina ($p>0,05$), sendo observado que o efeito negativo quadrático de NAT indica que %T aumenta até certa concentração de NAT, e depois de chegar a essa concentração crítica esse parâmetro diminuiu de forma quadrática (Figura 9). Ramos *et al.* (2012) observaram que a transmissão e a transparência de filmes de isolado protéico de soro e soro concentrado estão numa faixa de 200 nm a 280 nm, tanto para filmes de IPS quanto para filmes de soro concentrado. Assim, os filmes feitos a partir de ambos os produtos de soro de leite tem excelentes propriedades de barreira a UV, essa característica é devido, provavelmente, ao seu elevado teor de anéis aromáticos e aminoácidos na estrutura da proteína, que é capaz de absorver a radiação (LIMPAN *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que filmes feitos com a proteína de soro de leite podem ser capazes de retardar a oxidação lipídica induzida pela luz UV em sistemas alimentares. Neste trabalho, foi mostrado também que a faixa visível está entre 350 e 800 nm, obtendo valores de %T mais baixos para filmes de IPS quando comparado com o filme de soro concentrado.

Em relação à adição de MMT, Sothornvit *et al.* (2010) observaram que os filmes de IPS incorporados com diferentes concentrações de montmorilonita sódica obtiveram redução na transparência de 14,38% (filme de IPS) para 4,22% (filme com 20 g de MMT) com o aumento do teor de argila. Esses autores relataram que a diminuição pode ser ocasionada pela aglomeração das nanopartículas de MMT. Rhim (2011) encontrou diminuição da transparência de 70,3% para 51,9% em filmes de nanocompósitos com o aumento da concentração de MMT. Diferente do que foi observado em nosso trabalho no qual as concentrações de MMT estudadas não interferiram na transparência dos filmes

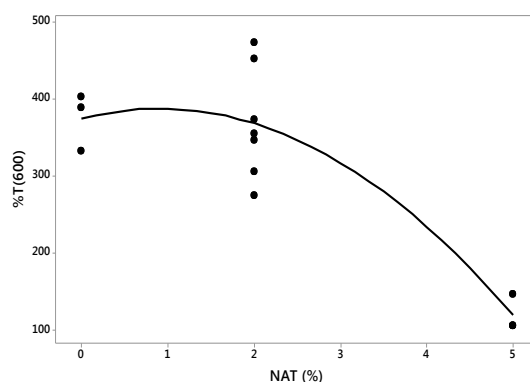


Figura 9. Resposta quadrática do parâmetro $\%T_{600}$ dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopias da superfície dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita e natamicina foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que estão representadas pelas, Figuras 10 e 11.

O filme contendo A (MMT0%NAT0%) (Figura 10a) apresentou superfície com bolhas, porém foi possível observar regiões que estão lisas e homogêneas (Figura 10b). O filme D (MMT1%NAT0%) e E (MMT3%NAT0%) apresentaram-se com bolhas e com pontos brancos aglomerados (Figura 10c e Figura 11d) devido a possível dispersão de MMT com partículas de tamanho médio de 10 μm (Figura 10d). A argila montmorilonita caracterizou-se como partículas aglomeradas brancas nas imagens do MEV (KUMAR *et al.*, 2010; AZEVEDO, 2013). Azevedo (2013) e Tunç e Duman (2010) observaram por MEV, imagens semelhantes de MMT com dimensão média de 3 μm e 15 μm , respectivamente.

Os filmes B (MMT0%NAT2%) e C (MMT0%NAT5%) apresentaram presença de cristais de natamicina em sua superfície, com formatos mais irregulares na matriz do IPS (Figura 10e e Figura 11a).

As micrografias dos filmes com a combinação de NAT e MMT, foi observado bolhas e aglomerados de MMT (Figuras 11b e 11c). Entretanto, nas Figuras 11d, 11e e 11f, observaram-se a ausência de bolhas e a formação de aglomerados de MMT. Já nos filmes H (MMT3%NAT2%) e I (MMT3%NAT5%) (Figuras 11e, 11f) observou-se cristais de MMT e de natamicina, respectivamente. Isto pode ser devido a alta concentração de natamicina utilizada na solução filmogênica, que pode ter obtido agregação de fases e ser observada após a secagem do filme.

A presença de cristais de antimicrobianos foram também detectados pela microscopia eletrônica de varredura em filmes de celulose contendo natamicina e nisina (PIRES *et al.*, 2008), em filmes de celulose contendo pediocina (SANTIAGO *et al.*, 2009) e em filmes de metil-celulose/glúten de trigo contendo natamicina (TÜRE *et al.*, 2009).

As alterações na superfície de filmes biodegradáveis, devido à presença de compostos ativos, colaboram negativamente em parâmetros como força de atração, permeabilidade a vapor de água, opacidade e solubilidade em água (BIERHALZ *et al.*, 2012).

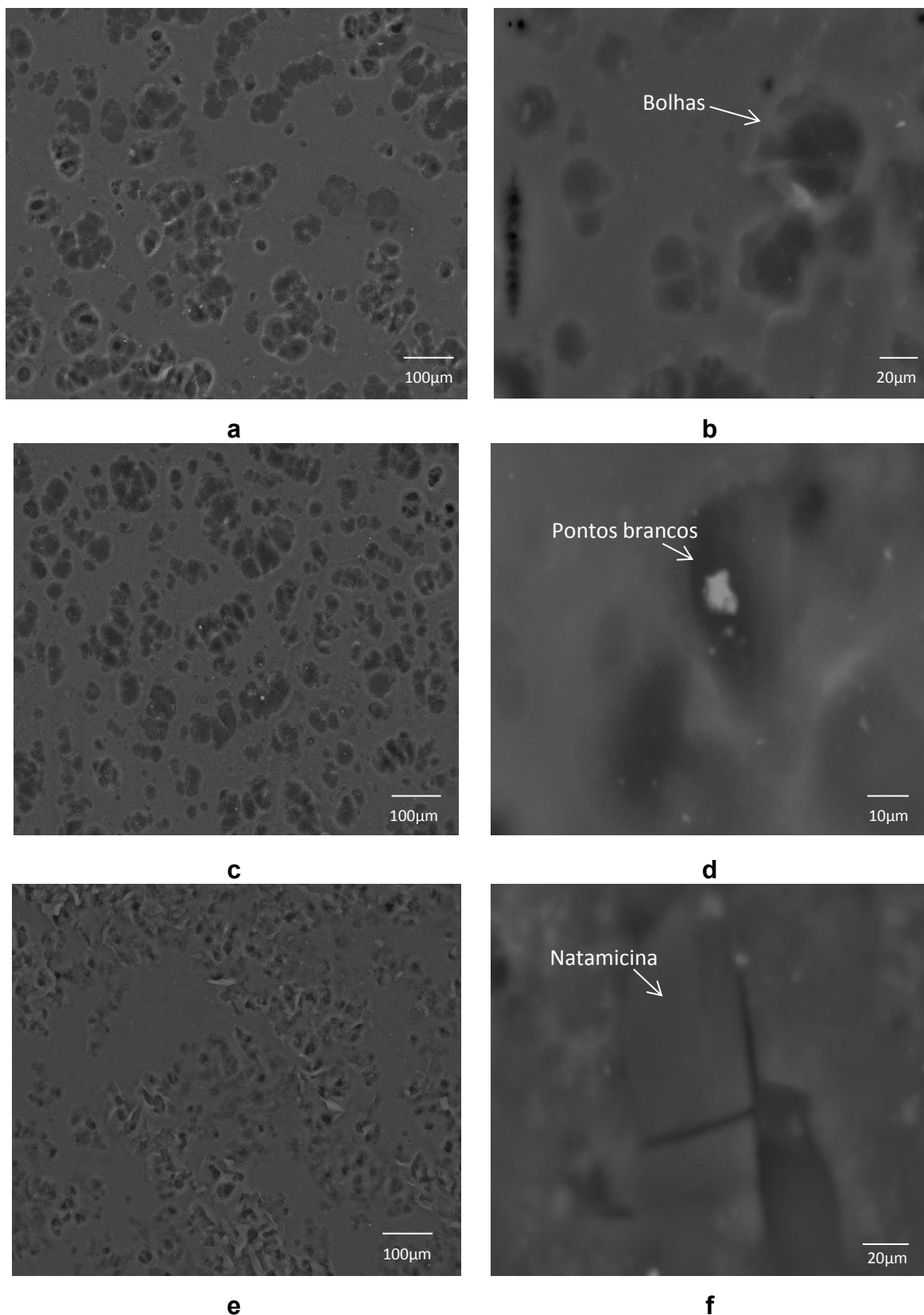


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT) resolução 1000X e 5000X, respectivamente. (a) e (b) MMT0%NAT0%; (c) e (d) MMT1%NAT0%; (e) e (f) MMT0%NAT2%.

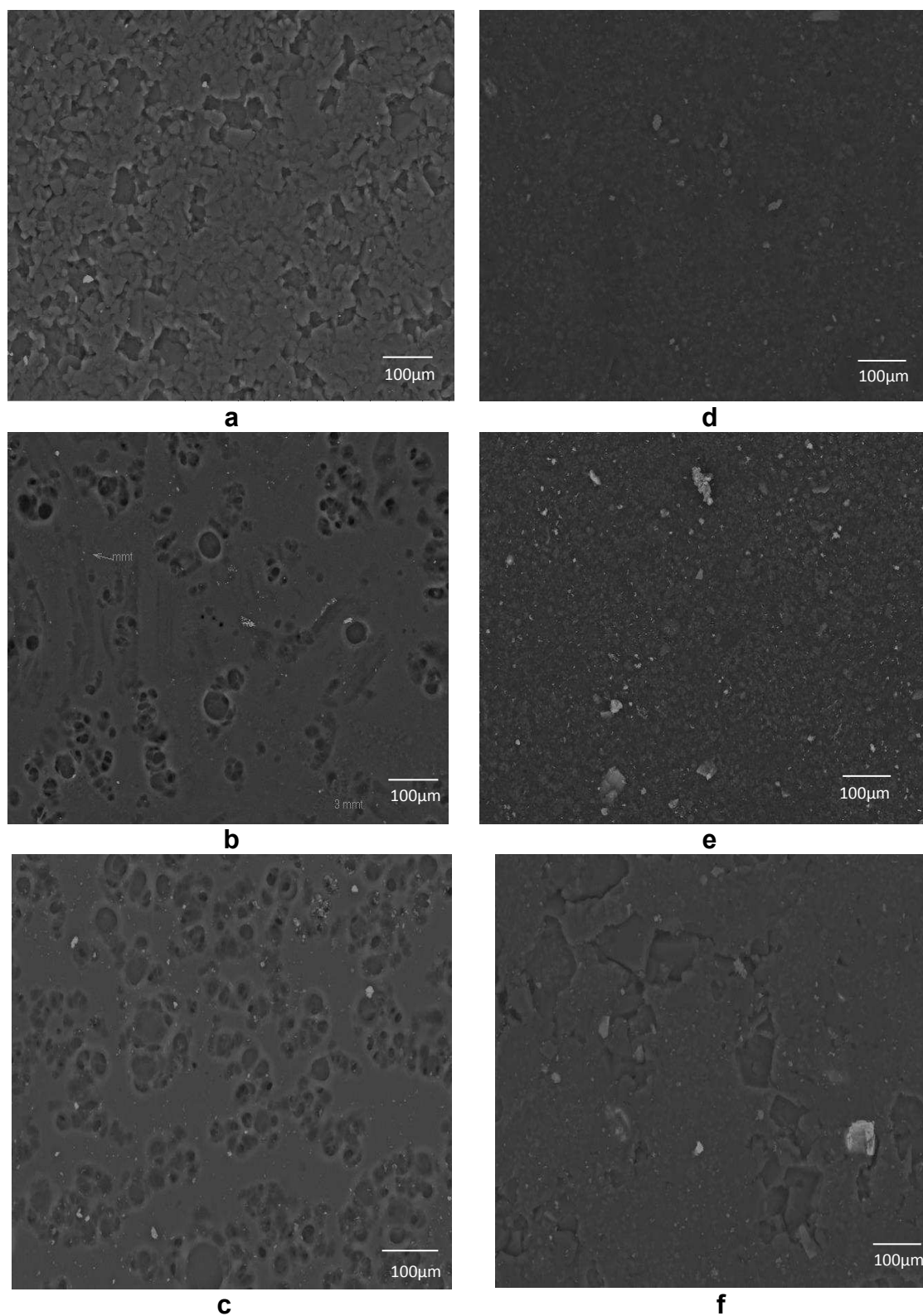


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT) na resolução 1000X. (a) MMT0%NAT5%; (b) MMT3%NAT0%; (c) MMT1%NAT2%; (d) MMT1%NAT5%; (e) MMT3%NAT2%; (f) MMT3%NAT5%.

3.6 Propriedades Mecânicas

Propriedades mecânicas dos filmes são características importantes para a avaliação de materiais de embalagens. Desta forma, o desempenho mecânico dos filmes desenvolvidos foi estudado por meio da determinação da resistência à tração (MPa), o alongamento na ruptura (%) e o módulo de elasticidade (MPa) (Tabela 4).

Os resultados encontrados com base no delineamento composto central mostram que a resistência à ruptura não foi afetada pela adição de MMT nos níveis estudados, porém obteve diferença entre os filmes nanocompósitos desenvolvidos na presença de natamicina. O alongamento na ruptura não obteve diferença, mas foi afetado pela presença de MMT e NAT. O módulo de elasticidade obteve diferença significativa, mas foi pouco afetado com adição de MMT e NAT (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas dos coeficientes de DCC, na avaliação das propriedades mecânicas do filme de isolado de soro protéico com concentrações de NAT (0, 2 e 5%) e MMT (0,1 e 3%).

Parâmetros	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
Resistência à tração (MPa)	$2,201^* - 0,1087^* \text{ NAT}$	0,4226	0,3480
Along. Ruptura (%)	$128,0^* - 18,09 \text{ NAT} - 34,6 \text{ MMT} + 13,06^* \text{ NAT.MMT}$	0,4240	0,0000
M. Elasticidade (MPa)	$90,03^* - 2,42 \text{ NAT} - 2,2 \text{ MMT} + 0,21 \text{ NAT}^2 + 0,27 \text{ MMT}^2$	0,1037	0,2090

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

A resistência à tração do filme não foi afetado pelas níveis de MMT (0, 1 e 3%) estudados, no entanto, quanto maior concentração de natamicina menor foi o resistência a tração do filme (Figura 12a). O módulo de elasticidade obteve pequena redução com adição das concentrações máximas de NAT e MMT (Figura 12b). Quando NAT e MMT foram analisados separadamente em seus valores máximos de concentração, o alongamento da ruptura obteve valores menores. Quando os dois fatores foram combinados em suas concentrações mínimas e máximas houve aumento no valor de alongamento da ruptura. Para concentrações intermediárias de NAT e MMT, o valor de alongamento também foram intermediários (Figura 12c).

A mudança de orientação nas camadas de argila montmorilonita poderia melhorar a resistência a tração (RT) e módulo de elasticidade (ME). Essa mudança é atribuída à elevada razão de aspecto e área de superfície das camadas de silicato, a

boa dispersão das camadas de argila na matriz polimérica e fortes interações entre eles (XU *et al.*, 2005; CYRAS *et al.*, 2008; SOTHORNVIT *et al.*, 2009). Entretanto, foi observado na análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que os filmes desenvolvidos obtiveram a presença de bolhas em sua superfície, podendo interferir nas propriedades mecânicas dos mesmos.

No trabalho de Zolfi (2014) os filme de isolado protéico de glúten incorporado com MMT, favoreceu aumento na RT e ME consideravelmente, mas o seu alongamento na ruptura (AR) foi significativamente diminuída. No entanto o valor de RT não interferiu em qualquer aumento no teor de MMT porque a probabilidade de esfoliação do MMT em filme nanocompósito é reduzida a concentrações mais elevadas da nanopartícula. Por outro lado, a aglomeração das nanopartículas em quantidades elevadas, aumenta as forças de atração entre eles (XU *et al.*, 2005).

A adição da NAT provocou redução dos parâmetros mecânicos estudados no filme de isolado protéico de soro. Bierhalz (2013) observou que a resistência à tração (RT) e alongamento na ruptura (AR) nos filmes incorporados com natamicina obtiveram perda na resistência mecânica em relação ao controle. Esse resultado pode ser atribuído as alterações na macro-estrutura polimérica, ou quando o agente antimicrobiano não foi devidamente incorporado (HAN *et al.*, 2000; NORAJIT *et al.*, 2010). Comportamento semelhante foi observado por Pires *et al.* (2008) em filmes de celulose com natamicina e por Cha e Chinnan (2004) estudando filmes de alginato contendo nisina.

Outro fator que pode influenciar os parâmetros mecânicos dos filmes é a adição de plastificante. No trabalho de Bierhalz (2013) ocorreu um aumento de 49% no alongamento na ruptura dos filmes com alginato com a adição de glicerol. Presupõe-se que uma fração do glicerol e/ou umidade existente no filme leva ao aumento na temperatura de transição vítrea e, por conseguinte, diminuição na deformação dos filmes.

A formação de filmes à base de proteínas em geral, requer a incorporação de uma quantidade mínima de plastificante a fim de reduzir sua fragilidade. Os plastificantes enfraquecem as forças intermoleculares entre as cadeias adjacentes do polímero, assim, ocorre aumento da extensibilidade e flexibilidade do filme, com diminuição no módulo de elasticidade e resistência à tração (ALVES *et al.*, 2007; SOBRAL *et al.*, 2001).

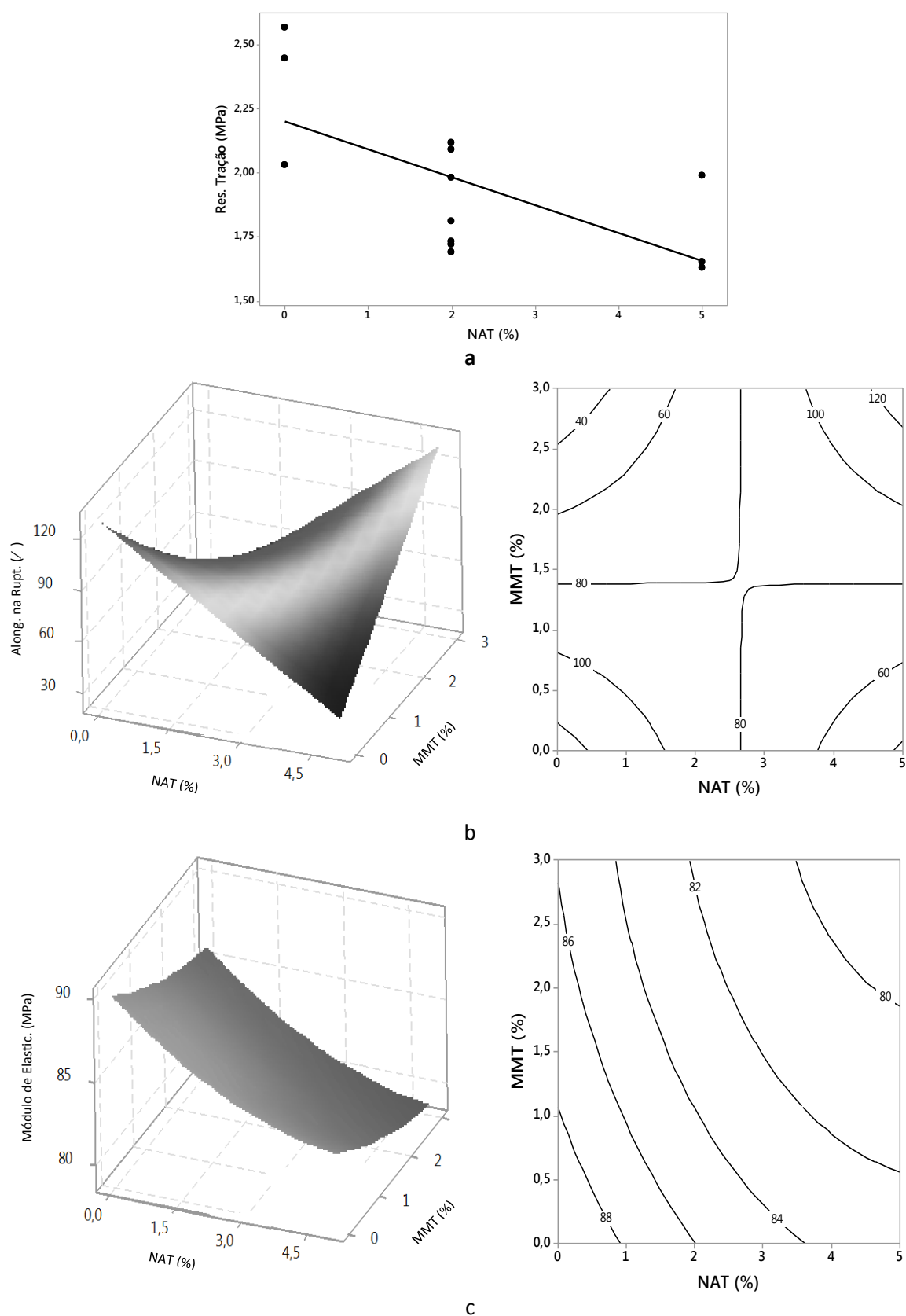


Figura 12. Propriedades mecânicas dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT). (a) Reta da resistência a tração; (b) e (c) superfície de resposta e análise de contorno do alongamento a ruptura e da módulo de elasticidade respectivamente.

3.7 Espectroscopia na região do Infravermelho - FTIR

A vibração localizada na faixa espectral de 800-1161 cm^{-1} é atribuída a bandas de glicerol correspondendo a bandas de vibrações de C-C e C-O (GUERRERO *et al.*, 2010, BARBOSA, 2011) (Figura 13). A vibração na região 3280 a 3276 cm^{-1} foi atribuída a banda de N-H e aparece geralmente em 3254 cm^{-1} , essa região corresponde a proteínas (RAMOS *et al.*, 2013).

Na região espectral de 3000-4000 cm^{-1} , observou-se que uma banda larga com intensidades próximas na faixa de 3276 a 3287 cm^{-1} foi formada para todos os filmes de isolado protéico de soro de leite (Figuras 13a, 13b, 13c). Essa região se refere a ligações cruzadas de proteínas que foram, provavelmente, derivadas a partir de um grau mais elevado de reticulação da rede protéica com cadeias mais próximas uma das outras promovidas por ligações de hidrogênio resultando em menor quantidade de grupos -OH livres (FAIRLEY *et al.*, 1996; MCHUGH *et al.*, 1994).

Houve a formação de picos fortes dos grupos amida em 1650 e 1590 cm^{-1} em todos os filmes que apresentaram picos na faixa de 1634 a 1638 cm^{-1} . Esses picos são atribuídos ao estiramento C=O e N-H, respectivamente (WANG *et al.*, 2005). Segundo Barbosa (2011), picos formados na faixa de 4000 a 1300 cm^{-1} , estão relacionados a grupos funcionais como OH, NH e C=O. No entanto, a adição de natamicina nos filmes G (MMT1%NAT5%) e I (MMT3%NAT5%) apresentou redução da intensidade dos picos 3380 a 3276 cm^{-1} , devido a interação entre a natamicina com o isolado protéico de soro (Figuras 13c). Bierhalz *et al.* (2013) relataram que picos em torno de 3.500-3.300 cm^{-1} também são atribuídos a NH, sendo característica de natamicina, e podem ser sobreposto por picos OH.

Para filmes processados por imersão, bandas perto de 2940 cm^{-1} , que correspondem às vibrações de alongamento CH, deslocam e diminuem o número de ondas (2920 cm^{-1}) e bandas de OH são deslocados para números de onda mais elevados (3270 cm^{-1}). De acordo com Cerqueira *et al.* (2012) o aumento da concentração de glicerol pode ser responsável por este comportamento. A redução da força de interação é relacionada com a frequência (ou comprimento de onda) no deslocamento de estiramentos vibracionais. Assim, quanto menor a frequência do pico mais forte é a interação (NING *et al.*, 2007; PAWLAK *et al.*, 2003).

O estiramento do grupo funcional -C-O está relacionado a vibração em 1084 cm^{-1} (ZHONG *et al.*, 2011).

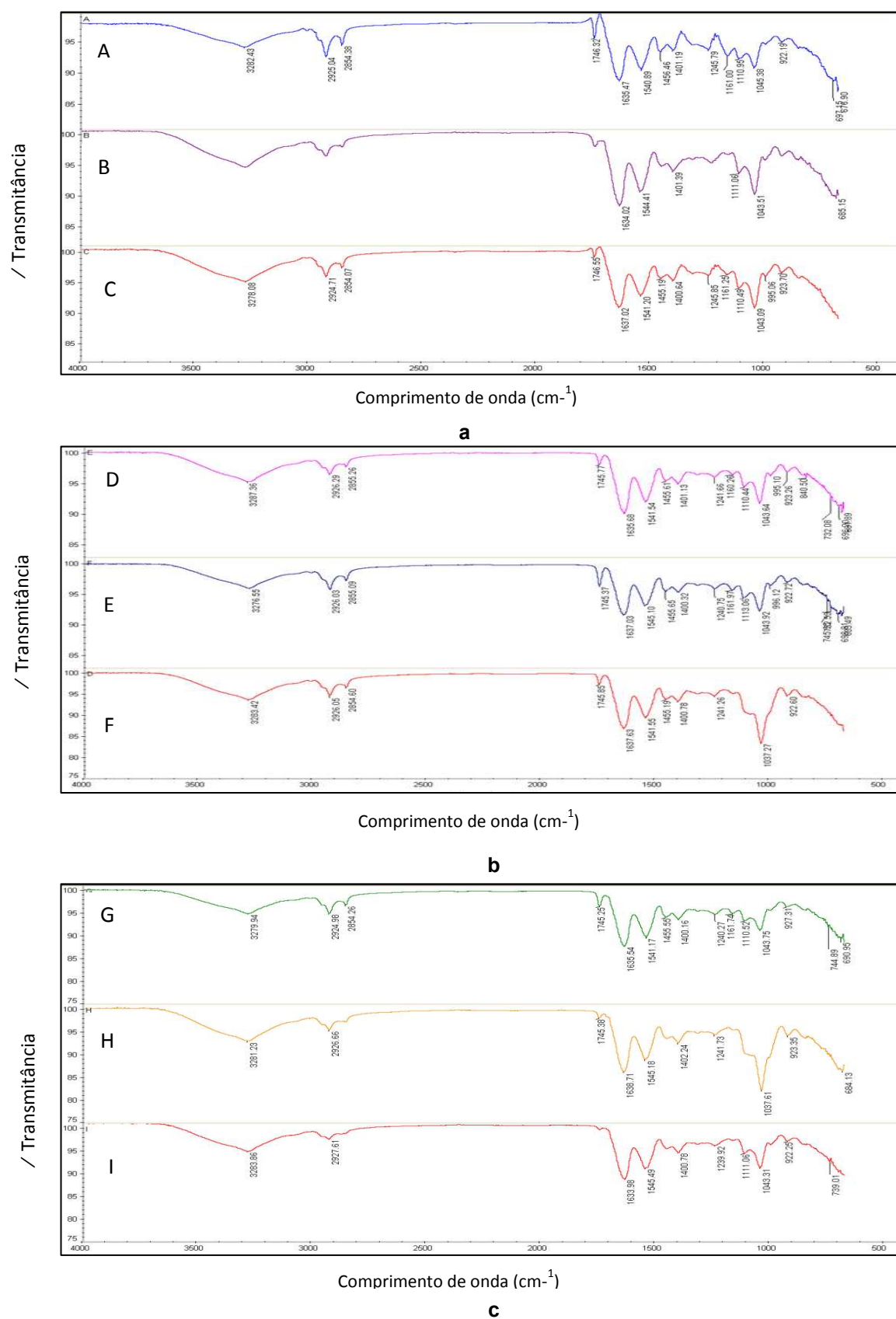


Figura 13. Espectroscopia no infravermelho dos filmes de isolado protéico de soro incorporado com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT). (a): (A) MMT0%NAT0%; (B) MMT0%NAT2%; (C) MMT0%NAT5%; (b): (D) MMT1%NAT0%; (E) MMT3%NAT0%; (F) MMT1%NAT2%; (c): (G) MMT1%NAT5%; (H) MMT3%NAT2%; (I) MMT3%NAT5%.

Conforme visualizado em todos os filmes em torno de 1043 cm^{-1} , a vibração pode ser deslocada para menores comprimentos de onda indicando aumento da interação entre os nanocompósitos. A vibração foi deslocada para 1037 cm^{-1} nos filmes D (MMT1%NAT0%) e H (MMT3%NAT2%). Avaliando a intensidade das vibrações, os filmes com 5% de natamicina apresentaram redução do comprimento de onda e consequente interação entre a natamicina e o isolado protéico de soro.

4. CONCLUSÃO

O efeito da combinação de MMT e NAT apresentou pequenas melhorias nas propriedades mecânicas, térmicas e ópticas dos filmes de isolado protéico de soro de leite.

Os filmes contendo maior concentração de natamicina apresentaram-se mais opacos, sendo que os filmes com e sem MMT apresentaram-se transparentes.

Todos os filmes apresentaram superfícies lisas, sem poros visíveis ou fissuras, flexíveis e com partículas distribuídas de forma homogênea.

Na difração de raio-X não foi possível observar esfoliação da argila montmorilonita sódica.

A estabilidade térmica do filme obteve pequeno aumento com a adição de MMT, sendo que a interação da NAT no soro diminui a estabilidade.

A resistência à ruptura diminuiu com a adição da natamicina, o alongamento na ruptura e módulo de elasticidade foram afetados com adição de MMT e NAT. O filme sem adição MMT e NAT apresentaram a superfície com bolhas e regiões mais lisas e homogêneas, foi possível observar cristais de MMT e NAT nos filmes desenvolvidos.

Os parâmetros colorimétricos b^* , opacidade, índice de amarelecimento (YI), índice de branco (WI) e %T600 foram influenciados com a adição natamicina.

As análises de espectroscopia no infravermelho dos filmes desenvolvidos mostraram interações entre natamicina, montmorilonita e IPS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V. D. *et al.* Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 941–946, 2007.

AMEFIA, A. E., ABU-ALI, J. M., BARRINGER, S. A. Improved functionality of food additives with electrostatic coating. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 7, p. 176–181, 2006.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for transparency of plastic sheeting. ASTM D1746-03.** Philadelphia, 2003a.

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. ASTM D882-02.** 10p Philadelphia, 2002.

AOUADA, F. A., MATTOS, L. H. C., LONGO, E. New strategies in the preparation of exfoliated thermoplastic starch–montmorillonite nanocomposites. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 34, p. 1502– 1508, 2011.

AZEVEDO, V. M. **Desenvolvimento de nanocompósitos de isolado protéico de soro de leite incorporados com agente antiescurecimento.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 92. 2013.

AZEVEDO, V. M., DIAS, M.V., BORGES, S.V., COSTA, A. L. R., SILVA, E.K., MEDEIROS, E.A.A., SOARES, N. F. F. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p.179 e 188. 2015.

AZEVEDO, V.M., SILVA, E.K., PEREIRA, C. F. G., J.M.G., BORGES., S.V. Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 252 e 258. 2015.

BALDWIN, E. A., HAGENMAIER, R., BAI, J. **Edible coatings and films to improve food quality.** 2 ed. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 448. 2012.

BARRETO, P. L. M., PIRES, A. T. N., & SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 147-152. 2003.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** Editora UFV. 2011.

BASCH, C., JAGUS, R., & FLORES, S. Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, p.1007-11947. 2012.

BIERHALZ, A. C. K., DA SILVA, M. A., KIECKBUSCH, T. G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**. v. 110, p.18–25. 2012.

BIERHALZ, A. C.K., SILVA, M. A., SOUSA, H. C., BRAGA, M. E. M., KIECKBUSCH. T. G. Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 76, 74-82p. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Conselho Nacional da Saúde.** Resolução nº 4 de 24 de novembro de 1988. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília-DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 28/2001.

CAMPOS, C., GERSCHENSON, L., & FLORES, S. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849-875. 2011.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 81, 2009.

CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 488 p. 2003.

CARR, L. G. **Desenvolvimento de embalagem biodegradável tipo espuma a partir de fécula de mandioca**. Tese (doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Engenharia Química. São Paulo, 2007.

CAGRI, A., USTUNOL, Z., RYSER, E. T. Antimicrobial edible films and coatings. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 833–848, 2004.

CE, N., NORENA, C.P.Z., BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. **Food**, v. 10, p. 21–26. 2012.

CERQUEIRA, A. M., COSTA, M. J., FUCIÑOS, C., PASTRANA, C. L., VICENTE, A. A. Natamycin-loaded poly(n-isopropylacrylamide) Nanohydrogels for smart edible packaging: Development and characterization. **Polymar**, p.150-151. 2013.

CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W.S., TEIXEIRA, J.A., VICENTE, A.A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study, **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 175–184. 2012.

CHA, D.S., CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 44, p. 223–237. 2004.

CHANG, P. R. JIAN, R., YU, J., MA, X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starchcomposites. **Food Chemistry**, v. 120 p. 736–740, 2010.

CHIVRAC, F. *et al.* New approach to elaborate exfoliated starch-based nanobiocomposites. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, p. 896–900, 2008.

CYRAS, V. P., MANFREDI, L. B., TON-THAT, M. T., & VAZQUEZ, A. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 55–63. 2008.

DA SILVA, M. A., KRAUSE BIERHALZ, A.C., Kieckbusch, T.G. Modelling natamycin release from alginate/chitosan active films. *Int. J. Food Sci. Technol*, v. 47, p. 740–746. 2012.

DE OLIVEIRA, T.M., DE FÁTIMA FERREIRA SOARES, N., PEREIRA, R.M., DE FREITAS FRAGA, K. Development and evaluation of antimicrobial natamycin

incorporated film in gorgonzola cheese conservation. **Packag. Technol. Sci.**, v. 20, p. 147–153. 2007.

DENAVI, G., TAPIA-BLACIDO, D. R., ANON, M. C., SOBRAL, P. J. A., MAURI, A. N., MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 90, p.341-349, 2008.

DELVES, B. J., THOMAS, L. V., DOAN, C. H., DAVIDSON, P. M. Natamycin. In: DAVIDSON, P. Michael; SOFOS, John N. e BRANEN, A.L. (ORG). Antimicrobials in food. **Food Science and Technology**, p. 143. 2005.

ESPITIA, P. J. P., SOARES, N. F.F., TEÓFILO, R. F., COIMBRA, J. S. R., VITOR, D. M., R. A. BATISTA, R. A., FERREIRA, S. O., ANDRADE, N.J., MEDEIROS, E.A. A. Physical–mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p.199– 208. 2013.

FAIRLEY, P. *et al.* Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 438-443, 1996.

FARID, M. A., EL-ENSHASY H. A., EL-DIWANY, A. I., EL-SAYED EL-S. A. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 403, p. 157–166, 2000.

FAJARDO, P., MARTINS, J.T., FUCINOS, C., PASTRANA, L., TEIXEIRA, J.A., VICENTE, A.A. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **J. Food Eng**, v. 101, p. 349–356. 2010.

FORNES, T. D., PAUL, D. R. **Polymer**, v . 44, p. 3945. 2003.

GUERRERO, P. *et al.* Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 145-151, 2010.

GONZÁLEZ, A. IGARZABAL, C. I. A. Soy protein e Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 289-296. 2013.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food technology**. v, 54, p. 56–65. 2000.

HAIR Jr, J. F., BLACK, W, C., BABIN, B. J., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L. **Análise Multivariada de Dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HONG, S. I., RHIM, J. W. Antimicrobial activity of organically modified nanoclays. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 5818–5824, 2008.

HU, G., CHEN, J., GAO, J. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 291-298, 2009.

KRISTO, E., KOUTSOUMANIS, K.P., BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.373–386. 2008.

KROCHTA, J. M., MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, p. 60-74, 1997.

KUMAR, P., SANDEEP, K. P., ALAVI, S., TRUONG, V. D., & GORGA, R. E. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 480–489. 2010.

LI, X. **A simulation evaluation of backward elimination and stepwise variable selection in regression analysis**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Estatística – Faculdade de Artes e Ciências – Universidade do Estado do Kansas, Manhattan. 2012.

MA, X. F., YU, J. G., MA, Y. B. Urea and formamide as a mixed plasticizer for thermoplastic wheat flour. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 111–116, 2005.

LIMPAN, N., PRODPRAN, T., BENJAKUL, S., & PRASARPRAN, S. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 85-92. 2010.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine, Buffalo**, v. 9, p. 136-156, 2004.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food hydrocolloids**, v. 27, p. 220-227, 2012.

MAYACHIEW, P., DEVAHASTIN, S. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. **Food Chemistry**, v. 118, p. 594-601, 2010.

MCHUGH, A. T. H., KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 416–423, 1994.

MULVIHILL, D. M., ENNIS, M. P. Functional milk proteins: Production and utilisation. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), **Advanced Dairy Chemistry**. 1. p. 1128–1176, 2003. New York NY, USA: Kluwer.

NIJDAM, J. *et al.* An x-ray diffraction analysis of crystallised whey and whey permeate powders. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, p. 2354–2364, 2007.

NING, W. *et al.* Effect of citric acid and processing on the performance of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 76, p. 68–73, 2009..

NORAJIT, K., KIM, K. M., RYU, G.H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 377–384. 2010.

OLLÉ RESA, C. P., JAGUS, R. J., GERSCHENSON, L. N. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. **Materials Science and Engineering**, v. 40, p. 281–287. 2014.

PAWLAK, A., MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, p. 153–166, 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, p. 53–61, 2009.

PINTADO, C. M. B. S., FERREIRA, M. A. S. S., SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. p. 21, 240–246. 2010.

PIRES, A. C. D., SOARES, N. D. F., DE ANDRADE, N.J., DO SILVA, L.H.M., CAMILLOTO, G.P., BERNARDES, P.C. Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. **Packag. Technol**, v. 21, p. 375–383. 2008.

POZSGAY, A., CRÁTER, T., SZÁZDI, L., MÜLLER, P., SAJÓ, I., PUKÁNSZKY, B. Europ. **Polym**, v. 40. 2003.

RAMOS, O. L. *et al.* Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 351–361, 2012.

RAMOS, O. L., REINAS, I., SILVA, S.I., FERNANDES, J.C., CERQUEIRA, M.A., PEREIRA, R.A., VICENTE, A. A., POÇAS, M.P., PINTADO, M. E., MALCATA, F.X. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p.110–122. 2013.

RAO, Y. Q. Gelatin-clay nanocomposites of improved properties. **Polymer Journal**, Singapore, v. 48, p. 5369–5375, 2007.

RHIM, J. W. Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 86, p. 691–699, 2011.

SANTIAGO-SILVA, P., SOARES, N.F.F., NÓBREGA, J.E., JÚNIO, M.A.W., BARBOSA, K.B.F., VOLP, A.C.P., ZERDAS, E.R.M.A., WÜRLITZER, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA - 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v. 20, p. 85–89. 2009.

SHI, R. *et al.* Characterization of citric acid/glycerol co-plasticized thermoplastic starch prepared by melt blending. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 69, p. 748–755, 2007.

SKURTYS, O., ACEVEDO, C. A., PEDRESCHI, F., ENRIONE, J., OSORIO F., AGUILERA, J. M. Food hydrocolloid edible films and coatings. In: CLARENCE, S. H.

(Eds.), **Food hydrocolloids**: Characteristics, properties and structures. Nova Science, 2009.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins – from ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.

SOBRAL, P. J. A., MENEGALLI, F. C., HUBINGER, 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.

SOTHORNVIT, R., HONG, S. I., AN, D. J., & RHIM, J. W. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 279–284. 2010.

SOTHORNVIT, R., RHIM, J. W., & HONG, S. I. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 468–473. 2009.

SU, J.-F., HUANG, Z., ZHAO, Y.-H., YUAN, X.-Y., WANG, X.-Y., & LI, M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 145 e 153. 2010.

TUNÇ, S., DUMAN, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. **Applied Clay Science**. v. 48, p. 414–424, 2010.

TÜRE, H., EROĞLU, E., SOYER, F., ÖZEN, B. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. **Int. J. Food Sci. Technol**, v. 43, p. 2026–2032. 2008.

TÜRE, H., EROĞLU, E., ÖZEN, B., SOYER, F. Physical properties of biopolymers containing natamycin and rosemary extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 402–408. 2009.

VARTIAINEN, J. *et al.* Biohybrid barrier films from fluidized pectin and nanoclay. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, p. 989–996, 2010.

WANG, S. F. *et al.* Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 123–131, 2005.

WANG, K. *et al.* Preparation, microstructure and thermal mechanical properties of epoxy/crude clay nanocomposites. **Composites Applied Science and Manufacturing**, Amsterdam, v. 38, p. 192–197, 2007.

WANG, X. *et al.* Impact of pre-processing of montmorillonite on the properties of melt-extruded thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Starch– Starke**, Hoboken, v. 61, p. 489–494, 2009.

XI, Y., DING, Z., HE, H. R., FROST, L., COLL. J. **Interf. Sci**, v. 277, p.116. 2004.

XU, Y., REN, X., HANNA, M. A. Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. **Journal of Applied polymer Science**, v. 99, p. 1684–1691. 2005.

YANG, L., PAULSON, A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, v. 33, p. 571–578. 2000.

YANG, L., PAULSON, A.T., NICKERSON, M.T. Mechanical and physical properties of calcium-treated gellan films. **Food Research International**, v. 45, p.1439–1443. 2010.

ZANETTI, M., CAMINO, G., REICHERT, P., MULHAIT, R. **Macromolecular rapid communications**, v. 22, p. 176. 2001.

ZOLFIA, M., KHO DAIYANA, F., MOUSAVIA, M., HASHEMIB, M. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran–whey protein by nanoparticle incorporation. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p.118–125. 2014.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 335–342, 2011.

Capítulo 2

EFEITO DE FILMES ATIVOS DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE NA CONSERVAÇÃO DE MUÇARELA FATIADA

RESUMO

Alimentos de origem animal como a muçarela fatiada, carregam em sua superfície micro-organismos capazes de causar doenças vinculadas por alimentos aos consumidores. Dessa forma, objetivou-se verificar a ação antimicrobiana dos filmes de isolado protéico de soro incorporado com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT) na inibição das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans* e a microbiota endógena da muçarela fatiada no teste de difusão em ágar, bem como a espessura e a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes ativos. Foi também analisada a aplicação dos filmes ativos na muçarela fatiada contra a multiplicação de fungos filamentosos e leveduras durante armazenamento sob refrigeração. As amostras foram acondicionadas em plástico de polietileno de baixa densidade a $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, durante 12 dias. A cada três dias, as amostras de muçarela fatiada foram avaliadas quanto ao pH, umidade e microbiota. A adição de NAT afetou a espessura dos filmes desenvolvidos. A taxa de permeabilidade ao vapor d'água aumentou nos tratamentos com MMT e NAT separadamente e diminuiu com a ausência e na combinação dos dois fatores, este último favorável para o armazenamento do alimento. O teste de difusão em ágar foi significativo para inibição de *S. cerevisiae*, *C. neoformans* e microbiota endógena do queijo muçarela. Durante 12 dias de armazenamento houve a redução de um ciclo log da microbiota endógena da muçarela fatiada. A utilização dos filmes ativos foram eficientes na conservação da muçarela fatiada, aumentando assim, a vida de prateleira do produto.

Palavras-chave: Embalagem ativa, inibição microbiológica e conservação.

1. INTRODUÇÃO

A muçarela é um queijo suave, de massa filada e era produzido exclusivamente a partir do leite de búfala, mas devido à grande escassez deste tipo de leite ocorreu

a substituição por leite de vaca (PIETROWSKI *et al.*, 2008). Atualmente, devido a sua grande aplicação culinária no preparo de massas, sanduíches quentes, saladas, churrascos e pratos em geral. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2015), o consumo per capita de queijo muçarela no Brasil atualmente é algo em torno de 1,2 kg e de 3,77% por ano. Nos países europeus essa especialidade de queijo é o de maior produção e consumo, que chega a cerca de 27 quilos por habitante por ano (SCOT, 2010).

Devido ao aumento do consumo de queijo muçarela e por se tratar de um alimento de origem animal, é de grande importância resaltar sobre a qualidade microbiológica do alimento a fim de evitar a ocorrência de intoxicação ao consumidor. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, uma doença vinculadas por alimentos é causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico. Assim, há necessidade de estabelecer padrões microbiológicos sanitários para queijos do tipo muçarela (LUNA *et al.*, 2009). Sendo necessário que haja um controle microbiológico desses alimentos. A adição de conservantes é uma alternativa para garantir a qualidade do produto.

A natamicina é um composto antifúngico natural sintetizado pela bactéria *Streptomyces natalensis* durante o processo de fermentação sendo utilizado na indústria de alimentos para a conservação de carnes e queijos embutidos (CHEN *et al.*, 2008). É um conservante reconhecido e aprovado como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration (FDA). De maneira que, é classificada como GRAS (Generally Recognized as Safe), e atribuído como um conservante natural pela União Europeia (TÜRE *et al.*, 2008).

A crescente demanda dos consumidores por produtos alimentícios com menos conservantes, tem intensificado a pesquisa sobre embalagem ativa antimicrobiana. Neste conceito inovador de proteção de alimentos, agentes antimicrobianos são incorporados em cadeias poliméricas e podem ser lentamente lançados sobre a superfície de alimentos, inibindo a deterioração microbiana na superfície do produto.

A liberação controlada do agente ativo permite a manutenção da concentração crítica necessária para inibir a multiplicação microbiana e, conseqüentemente, a quantidade de aditivos adicionados ao produto é reduzida (APPENDINI *et al.*; 2002; BASTARRACHEA *et al.*; 2011). Além disso, embalagem

ativa antimicrobiana é um método alternativo para superar limitações da adição direta de conservantes nas formulações de alimentos, como a redução do seu potencial antimicrobiano devido reações e/ou interação com os componentes da matriz alimentar (HAN, 2000; GEMILI *et al.*; 2009; CAMPOS, 2011).

Embalagens ativas podem ser produzidas a base de proteínas do soro, que é um coproduto da indústria de laticínios, sendo uma alternativa de substituição aos plásticos convencionais. A embalagem de soro de leite é ideal para carrear aditivos alimentares, tais como antioxidantes, antimicrobianos, corantes, sabores, nutrientes fortificantes e especiarias (SALMIERI e LACROIX, 2006).

Algumas pesquisas já têm sido realizadas para a avaliação do efeito da combinação de filmes ativos e agentes antimicrobianos para produtos de origem animal, a fim de inibir a multiplicação microbiana e consequentemente a deterioração do alimento. Baseando-se no fato de que a natamicina atua como agente antimicrobiano no controle de fungos filamentosos e leveduras, a sua ação antifúngica é devido a afinidade da substância pelo ergosterol, 24 e 28-dehidroergosterol e o colesterol, esterol presente na membrana celular de fungos e leveduras sendo pouco encontrado em bactérias (BRUSTOLIN, 2011), acredita-se que a adição desse composto em um filme ativo possa prevenir a multiplicação desses micro-organismos em muçarela fatiada. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do filme nanocompósitos de isolado protéico de soro de leite desenvolvido no capítulo 1 na prevenção de deterioração e manutenção da muçarela fatiada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para montagem do experimento, o queijo muçarela foi obtido do Laticínios Funarbe localizado no campus da Universidade de Viçosa na cidade de Viçosa-MG.

2.1 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento composto central (DCC) com duas variáveis para estudar o efeito combinado de nanopartículas de argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT) sobre as propriedades de barreira e antimicrobiana dos filmes de isolado protéico de soro (IPS) e avaliado pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O modelo estatístico que representa a influência do MMT e NAT sobre as propriedades de barreira e antimicrobiana do filme foi desenvolvido e validado através da análise de variância (ANOVA).

Para melhores resultados no modelo de regressão, utilizou-se o procedimento de exclusão de variáveis (stepwise) a partir da análise da estatística t das variáveis, conforme realizado por Li (2012). Neste procedimento, todas as variáveis são incluídas no modelo e vão sendo retiradas uma a uma, em função da contribuição significativa dada pela análise da significância da estatística t. A técnica consiste em eliminar as variáveis não significativas, que correspondem àquelas que apresentam o menor valor da estatística t, em valor absoluto, por se tratar das variáveis de menor importância (HAIR Jr *et al.*, 2009). Para as variáveis significativas, procedeu-se a análise de correlação para quantificar o grau de correlação com a variável resposta. A avaliação da aplicação do filme no alimento foi observada pela taxa de inclinação, assim como o pH e umidade da muçarela fatiada.

2.2 Produção dos filmes

Os filmes ativos desenvolvidos no capítulo 1 estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita e natamicina.

Tratamentos	Concentrações*
A	MMT0%NAT0%
B	MMT0%NAT2%
C	MMT0%NAT5%
D	MMT1%NAT0%
E	MMT3%NAT0%
F	MMT1%NAT2%
G	MMT1%NAT5%
H	MMT3%NAT5%
I	MMT3%NAT5%

*Argila montmorilonita (MMT) Natamicina (NAT)

2.3 Armazenamento

A muçarela fatiada foi intercalada com os filmes ativos e o sistema acondicionado em saco de plástico de polietileno de baixa densidade, e armazenadas em condições controladas com temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR de $82\% \pm 2$, durante 12 dias (Figura 1).



a



b

Figura 1. Muçarela fatiada embalada com filme ativo e acondicionada em saco de polietileno de baixa densidade (a); armazenamento da muçarela fatiada sob condições controladas de temperatura e umidade (b).

2.4 Espessura do filme isolado protéico de soro

A espessura média dos filmes (mm) foi mensurada com auxílio de micrômetro (Mitutoyo, modelo 547-401). As medidas foram realizadas em dois corpos de prova de cada tratamento em três repetições, realizando-se as medidas em dez pontos aleatórios (CAMILLOTO, 2009).

2.5 Estudo da propriedade de barreira ao vapor de água (TPVA)

A taxa de permeabilidade a vapor d'água (TPVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, seguindo a ASTM E 96/ E 96M – 05 (ASTM, 2005) com algumas modificações. Foram utilizadas cápsulas circulares ($\varnothing = 82,3$ mm) com paredes impermeáveis, contendo 30 g de cloreto de cálcio anidro com granulometria entre 600 μm e 2,36 μm . Os filmes foram vedados com parafina na junção filme/cápsula. As cápsulas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio com o objetivo de manter a umidade relativa em torno de 75%. O ganho de massa associado a umidade permeada pelo filme foi avaliado por meio gravimétrico. A TPVA foi expressa em $\text{g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$.

2.6 Avaliação antimicrobiana do filme ativo

2.6.1 Micro-organismos

A atividade antimicrobiana do filme ativo foi testada contra as leveduras *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* e a microbiota endógena do queijo muçarela.

2.6.2 Teste de difusão em ágar

Para avaliar a atividade antimicrobiana do filme foi aplicado o teste de difusão em ágar segundo Hanusová *et al.* (2010) modificado, colocando-se discos ($\varnothing = 0,8$ cm) do filme ativo incorporados com natamicina e MMT sobre a superfície de Potato Dextrose Agar (PDA) acidificado com 1% de ácido tartárico em pH de 4,5 a 5,0, inoculados com 0,1 mL (10^5 UFC/mL) dos micro-organismos. Em seguida, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar com auxílio de alça de Drigalsky. Posteriormente, as placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. A atividade inibidora foi quantificada por medição do diâmetro total (diâmetro do disco mais zona de inibição).

2.7 Aplicação dos filmes ativos no queijo muçarela

Foi realizada análise microbiológica referente às leveduras e fungos filamentosos encontrados na microbiota natural do queijo muçarela nos tempos 0, 3, 6, 9, 12 dias de conservação. As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologias descritas pela American Public Health Association (APHA, 2004). O resultado foi expresso em LogUFC/g de queijo muçarela. Cada fatia do queijo muçarela (25 g cada) foi embalada intercalando filme ativo, queijo muçarela e filme ativo. Este conjunto foi ainda acondicionado em embalagens de polietileno de baixa densidade, e conservado a 4°C $\pm$ 2°C.

2.8 Caracterização físico-química do queijo muçarela

As alterações do queijo muçarela durante o período de armazenamento foram avaliadas utilizando-se análises de pH e umidade. O produto foi analisado nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias de conservação e o experimento foi conduzido em delineamento do composto central.

2.8.1 Potencial Hidrogeniônico

O pH das amostras de queijo muçarela foram preparadas segundo Instituto Adolfo Lutz (2004), em duplicata, diluindo-se aproximadamente 5 g de queijo muçarela triturado em 50 mL de água destilada. Após completa homogeneização, o pH foi determinado em medidor de pH (Digimed Instrumentação Analítica Ltda).

2.8.2 Umidade

O teor de umidade presente no queijo muçarela foi determinado por meio da perda por dessecação em estufa a 105 °C conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) (Equação 1).

$$U = \frac{N \times 100}{P} \quad \text{eq. 1}$$

Em que U é umidade encontrada em percentagem, N é número de gramas de umidade (perda de massa em g) e P é o número de gramas da amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espessura

A espessura dos filmes de isolado protéico de soro não foi afetada pela adição de MMT nos níveis de concentrações estudados que foi de 1 a 3 % de MMT. Os resultados da espessura mostraram que essa propriedade teve diferença significativa entre os filmes nanocompósitos desenvolvidos com base no DCC quando houve adição de natamicina nas concentrações estudadas (0, 2 e 5%) (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas dos coeficientes de DCC, da presença de natamicina na espessura dos filmes de isolado protéico de soro.

Espessura	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
(mm)	0,19033* - 0,02146* NAT + 0,00272* NAT ²	0,6272	0,3120

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos (p>0,05).

* Significativo pelo teste t de Student (P<0,05)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

A menor espessura foi obtida com 3,94% de natamicina com pequena diferença de espessura (0,150-0,190 ± 0,04 mm) entre os tratamentos (Figura 2), isso devido a interação da natamicina com o isolado protéico de soro. Bierhalz *et al.* (2013) observaram que nos filmes de alginato com natamicina a espessura dos filmes não se alterou significativamente com a adição do antifúngico. Balaguer *et al.* (2014) desenvolveram filmes de gliadina (proteína isolada do glúten) reticulado com diferentes quantidades de cinamaldeído e incorporados de 0,5; 2,5 e 5% de natamicina, os filmes não obtiveram diferença significativa na espessura (p>0,05) em

relação aos filmes sem natamicina. A espessura é um parâmetro importante para filmes e geralmente influencia nos parâmetros como permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas e liberação de agentes ativos.

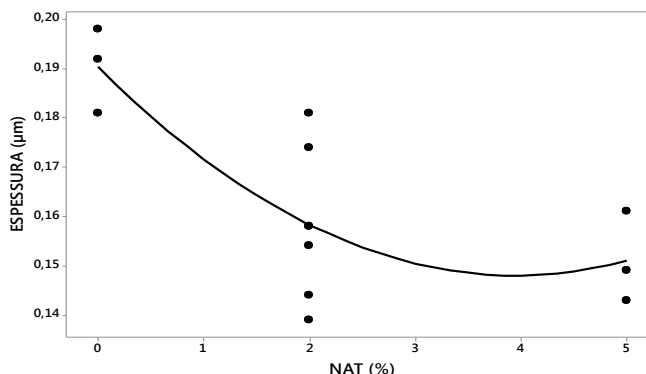


Figura 2. Espessura dos filmes de isolado protéico de soro com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT). Resposta quadrática da espessura em função das concentrações de natamicina (0, 2 e 5%).

3.2 Taxa de permeabilidade ao vapor d'água

A avaliação individual de MMT e NAT, bem como, a interação desses fatores obtiveram resultados independentes na taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), mesmo com $p < 0,05$ e o valor de R^2 baixo (Tabela 3). O controle de espessura é uma variável importante em estudos de propriedades de barreira. Com o aumento da espessura, ocorre redução da resistência à transferência ao vapor de água e menor TPVA (MCHUGH *et al.*, 1993).

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de DCC, da presença de NAT e MMT na TPVA dos filmes de IPS.

TPVA	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
(g/m ² . dia ²)	3,533* + 0,3037 NAT + 0,359 MMT - 0,1633* NAT.MMT	0,5709	0,0420

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Filmes à base de proteínas ou materiais biodegradáveis necessitam possuir baixa permeabilidade ao vapor d'água ou a gases, quando são utilizados como embalagens. Na Figura 3, os níveis de NAT (0, 2 e 5%) e MMT (0, 1 e 3%) estudados tanto na ausência quanto na presença dos dois componentes, nas suas concentrações máximas, resultaram em menores valores de TPVA. Porém, quando os componentes foram avaliados sozinhos no filme, resultaram em uma maior TPVA,

sendo que as concentrações intermediárias de NAT e MMT apresentaram valores intermediários de TPVA (Figura 3). O isolado protéico de soro é um polímero hidrofílico que possui grupos hidroxílicos, assim, a água poderia facilmente permear o filme. Entretanto, na presença de MMT, uma barreira física é formada com a dispersão das lamelas de MMT na matriz polimérica dificultando a passagem de vapor de água (NING *et al.*, 2009; RAY & OKAMOTO, 2003).

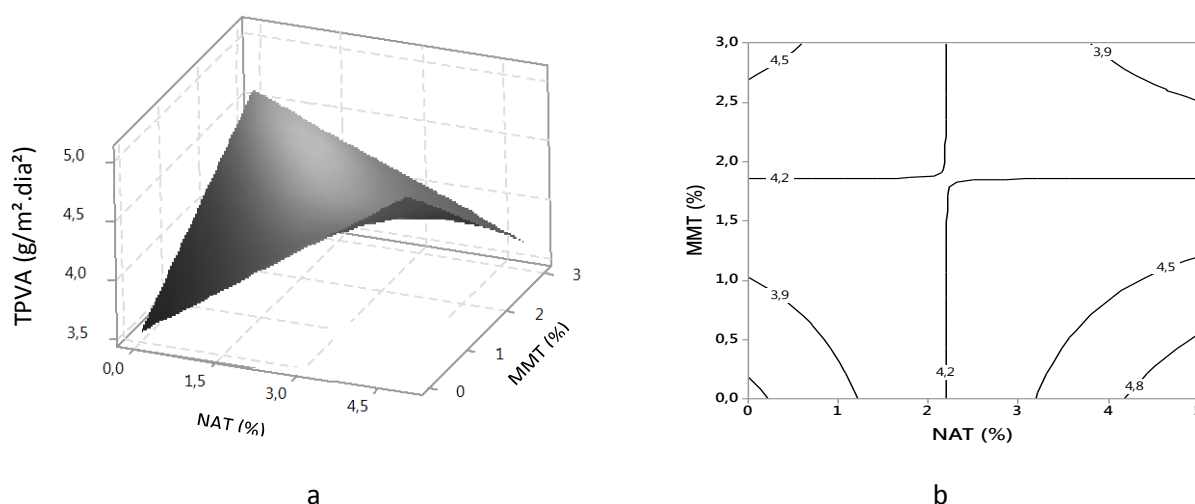


Figura 3. Taxa de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes de isolado protéico de soro incorporados com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT). (a) Superfície de resposta da TPVA em função da concentração de NAT e MMT. (b) Análise de contorno da TPVA em função da concentração de NAT e MMT.

As camadas de silicato da argila montmorilonita, quando bem distribuída na matriz do polímero, podem se comportar como um obstáculo. Melhorando a impermeabilidade ao vapor d'água devido a sua natureza hidrofílica e compatibilidade com biopolímero hidrofílicos como IPS, esse aspecto faz com que as moléculas de vapor d'água passam por uma barreira física, aumentando o tempo de difusão e consequentemente a redução da permeabilidade (SOTHORNVIT, *et al.*, 2010; KUMAR, *et al.*, 2010).

Zhou *et al.* (2009) relataram que filmes com nanopartículas MMT e óxido de alumínio (Al_2O_3) mostram redução na permeabilidade ao vapor d'água de nanocompósitos. Nos filmes de isolado protéico de soro com nanopartículas de dióxido de titânio ocorreu uma redução em torno de $2,89 \times 10^{-10} \text{ gm}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ na permeabilidade ao vapor de água com concentração acima de 0,25% de dióxido de titânio (Li *et al.*, 2011). Filmes contendo apenas isolado protéico de soro (IPS) apresentaram baixa permeabilidade ao vapor d'água, decorrente do aumento na concentração de IPS, que apresenta em sua estrutura grupos hidroxílicos em maior

quantidade, e que consequentemente interferem na TPVA (KOKOSZKA *et al.*, 2010).

A adição de natamicina no filme promoveu aumento da TPVA, no entanto quando combinada com MMT apresentou diminuição na TPVA. Krause *et al.* (2012) observaram também que a incorporação de natamicina em filmes individuais ou compósitos à base de alginato e pectina provocou um aumento significativo ($p < 0,05$) na permeabilidade ao vapor de água. Ao contrário do que foi observado em filmes de quitosana incorporado com natamicina, a qual não afetou significativamente ($p < 0,05$) o valor da permeabilidade ao vapor d'água (FAJARDO *et al.*, 2010).

No trabalho de Bierhalz *et al.* (2013) observou-se que a adição de natamicina provocou aumento significativo ($p > 0,05$) do coeficiente de permeabilidade no filme de alginato. Vários estudos sobre filmes ativos relatam um aumento na permeabilidade ao vapor d'água com a adição do agente antimicrobiano, como natamicina, devido a sua baixa solubilidade e por apresenta heterogeneidade micro ou macro na estrutura polimérica (PRANOTO *et al.*, 2005; KRISTO *et al.*, 2008).

3.2 Teste de difusão em ágar

A atividade antifúngica do filme ativo foi avaliada para *C. neoformans*, *S. cerevisiae* e a microbiota endógena do queijo muçarela pelo teste de difusão em ágar. Os tratamentos A (MMT0%NAT0%), B (MMT0%NAT2%), C (MMT0%NAT5%) e I (MMT3%NAT5%) apresentaram zonas de inibição de $0,8 \pm 0,2$; $4,4 \pm 0,2$; $4,9 \pm 0,2$ e $4,5 \pm 0,2$ cm de diâmetro respectivamente para todos os micro-organismos avaliados (Figura 4).

No teste de difusão em ágar para *C. neoformans* a inibição foi significativa ($P > 0,05$) (Tabela 4) e obteve-se maior zona de inibição com a concentração de 3,67% de natamicina (Figura 4). Apesar da formação de zona de inibição para *C. neoformans*, não foi possível encontrar relatos da ação da natamicina para essa levedura, é a primeira vez que esse fato acontece para filmes ativos. No entanto, o mecanismo de ação da natamicina para leveduras e fungos filamentosos está relacionado à sua afinidade aos esteróis da membrana celular dos mesmos, promovendo a formação de canais iônicos que interferem na permeabilidade celular, o que pode levar a morte da célula (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 2005).

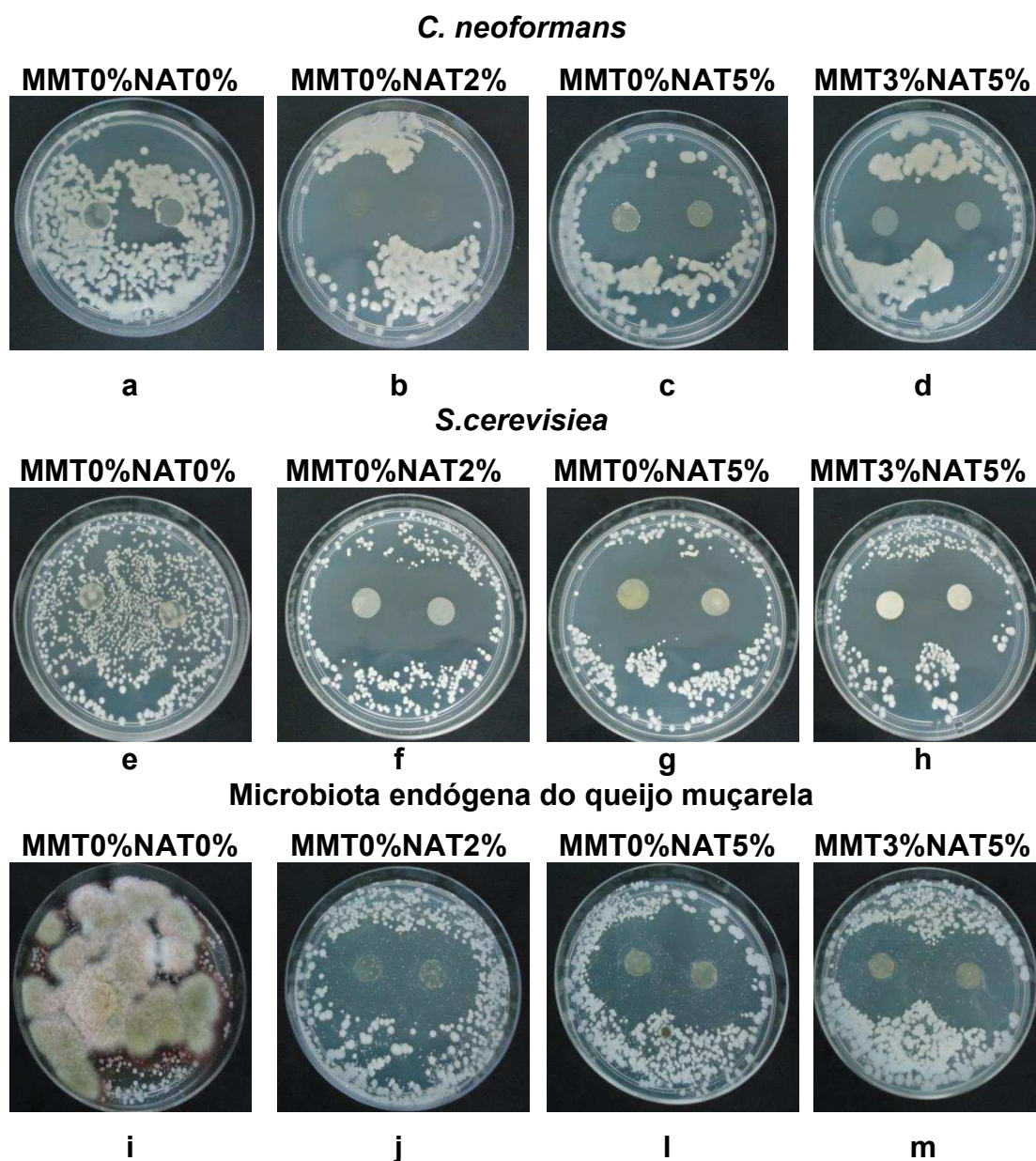


Figura 4. Teste de difusão em ágar dos filmes de isolado protéico de soro incorporado com argila montmorilonita (MMT) e natamicina (NAT). MMT0%NAT0% (a, e, i); MMT0%NAT2% (b, f, j); MMT0%NAT5%(c, g, l) e MMT3%NAT5% (d, h, m). Diâmetro da zona de inibição para *C. neoformans*, (a, b, c, d) *S. cerevisiea* (e, f, g, h) e Microbiota endógeno do queijo (i, j, l, m).

Tabela 4. . Estimativas dos coeficientes de DCC, na presença de NAT e MMT no teste de halo dos filmes de IPS.

Variável	Equação	R ²	FAJ ^b
<i>S. cerevisiae</i>	$0,8011^* + 2,7593^* \text{ NAT} - 0,0009^* \text{ MMT} - 0,3950^* \text{ NAT}^2 - 0,0357^* \text{ NAT.MMT}$	99,72%	0,5180
<i>C. neoformans</i>	$0,8000^* + 2,0675^* \text{ NAT} - 0,2748^* \text{ NAT}^2$	98,82%	0,2490
Microbiota endógena	$0,8728^* + 2,1147^* \text{ NAT} - 0,283 \text{ MMT} - 0,2811^* \text{ NAT}^2 + 0,0914^* \text{ MMT}^2$	99,51%	0,1090

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

No teste de difusão em ágar para *S. cerevisiae* foi significativa ($P>0,05$) (Tabela 4) e obteve-se a maior zona de inibição nas concentrações de 3,49; 3,44 e 3,36% de natamicina (Figura 4a).

Ollé Resa *et al.* (2014) observaram que a adição de natamicina presente em filmes de amido formou zona de inibição de $2,97 \pm 0,2$ cm para *S. cerevisiae*. Ollé Resa *et al.* (2013) também observaram que o filme de fécula de mandioca contendo 9,25 mg de natamicina por dm^2 de filme manteve um bom desempenho após 10 dias de contato prévio à inoculação com *S. cerevisiae*. No trabalho de Pires *et al.* (2008) filmes com natamicina e filmes combinado com natamicina e nisina em queijo muçarela inibiram *Penicillium sp.* e *Geotrichum sp.* com zonas de inibição de 4,8 e 2,3 cm de diâmetro, respectivamente.

Para microbiota endógena do queijo muçarela a inibição também foi significativa ($p>0,05$), obtendo-se a maior zona de inibição de com 3,76% de natamicina (Figura 4c), isso ocorre devido a interação da natamicina com a proteínas do soro que se difundiu no ágar. Balaguer *et al.* (2014) observaram zonas de inibição na avaliação de filmes de gliadina (proteína isolada do glúten) com natamicina para queijos macios e semi-macios, sendo que em queijos macios a zona de inibição foi maior que em queijos semi-macios, isso foi devido a maior atividade de água presente em queijos macios, assim como no queijo muçarela. Embora, o efeito inibitório de natamicina em leveduras e fungos filamentosos seja amplamente conhecido ainda são poucos os estudos realizados sobre o efeito de natamicina na microbiota endógena de queijos. No entanto, já há estudos em que este antifúngico é adicionado em filmes biodegradáveis como de quitosana, proteínas de soro de leite, quitosana e alginato/pectina (PINTADO *et al.*, 2010; HANUSOVA *et al.*, 2010; FAJARDO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012.; BIERHALZ *et al.*, 2012).

Os resultados destes estudos mostram que a natamicina incorporado em filmes de isolado protéico de soro podem controlar a multiplicação de micro-organismos deterioradores, incluindo leveduras e fungos filamentosos, melhorando a vida de prateleira de queijos.

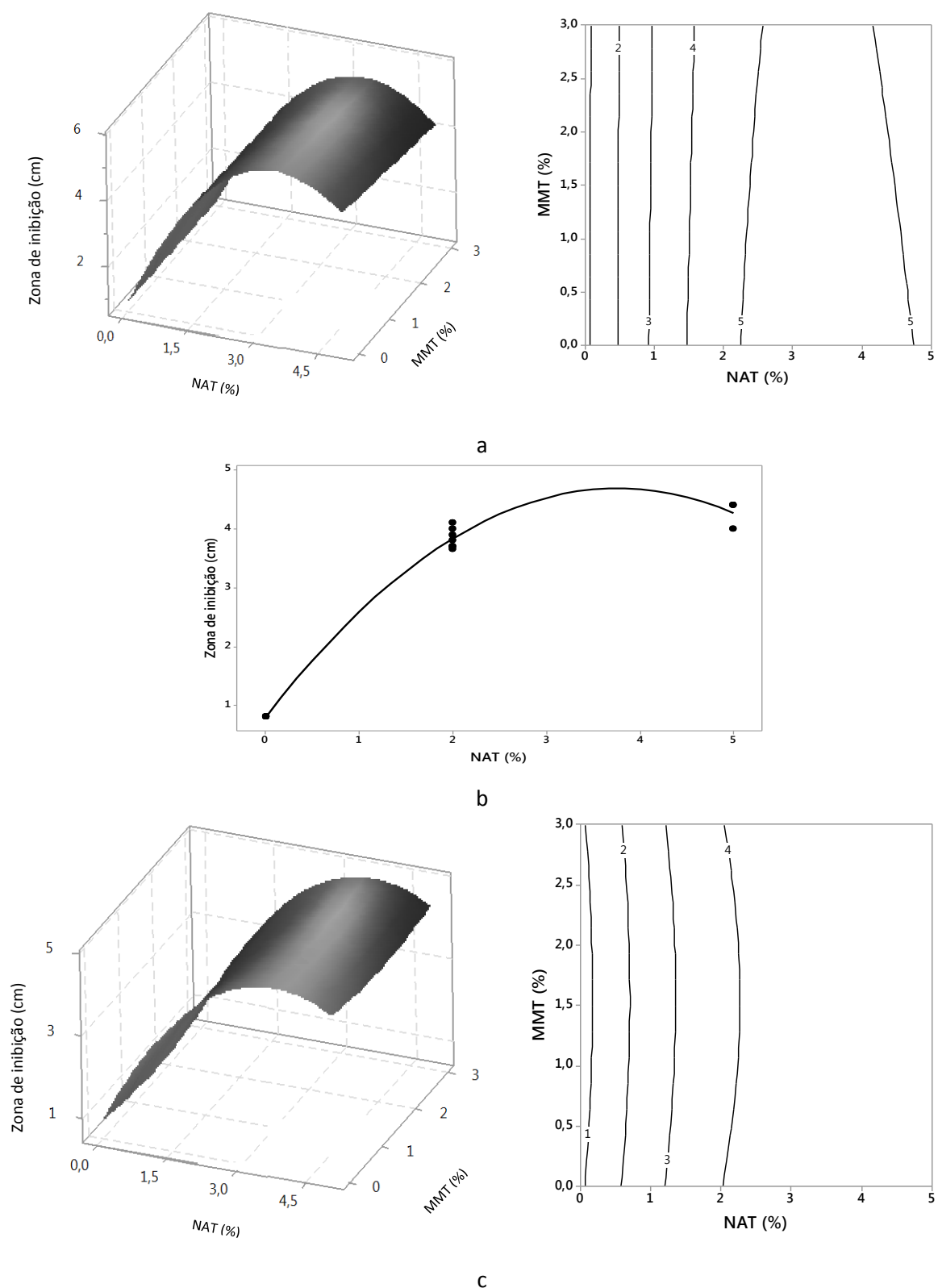


Figura 4. Teste de difusão em ágar dos filmes ativos. (a) Superfície de resposta e de contorno da zona de inibição da levedura *S. cerevisiae*; (b) Zona de inibição da levedura *C. neoformans*; (c) Superfície de resposta e contorno da zona de inibição da microbiota endógena do queijo muçarela

3.4 Avaliação microbiológica da muçarela fatiada

As análises microbiológicas da muçarela fatiada foram realizadas durante 12 dias, a cada 3 dias. Avaliou-se a inibição da multiplicação da microbiota endógena na muçarela devido a liberação controlada da natamicina. O resultado foi expresso em LogUFC/g (Figura 5). Simultaneamente foram realizados as análises de pH e umidade das fatias, e os resultados expresso por taxa de inclinação da curva (Tabela 5).

Houve a redução de um ciclo log nos tratamentos contendo NAT e NAT com MMT (Figura 5c e 5d) sendo que nos tratamentos contendo somente IPS (Figura 5b) não houve redução acentuada da microbiota endógena da muçarela durante 12 dias de conservação. A argila montmorilonita não interferiu na ação antimicrobiana da natamicina. A ação da natamicina foi efetiva a partir do nono dia de análise.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pires *et al.* (2008), que avaliaram o efeito antimicrobiano *in vitro* de um filme à base de celulose incorporado com natamicina sobre *Penicillium sp.* e *Geotrichum sp.* Além disso, esses autores aplicaram os filmes desenvolvidos para a preservação de fatias de muçarela e encontraram redução de dois ciclos log de leveduras, alcançando uma extensão da vida útil de 6 dias, em comparação a amostra controle.

Há muitos trabalhos realizados para comprovar a eficácia da liberação da natamicina para sistemas de conservação do queijo. Pintado *et al.* (2010) observaram a inibição de *Penicillium sp.* *in vitro* com filme de isolado protéico de soro de leite incorporando com natamicina. Estudos para outros tipos de queijos em contato com filmes biodegradáveis incorporados com natamicina foram realizados, como o de Oliveira *et al.* (2007) que incorporou NAT em filmes à base de celulose inibindo *P. roqueforti* presente na superfície de queijo Gorgonzola. Ture *et al.* (2008) avaliaram o efeito antimicrobiano de natamicina em filme de metilcelulose/glúten de trigo e observaram que houve redução de 2 ciclos log para *A. niger* inoculado na superfície do queijo Kashar, e em filme de quitosana contendo 0,05 mg/mL de NAT que levou a redução de 1,1 ciclo log da microbiota endógena do queijo Saloio, após 27 dias de armazenamento (FAJARDO *et al.*, 2010).

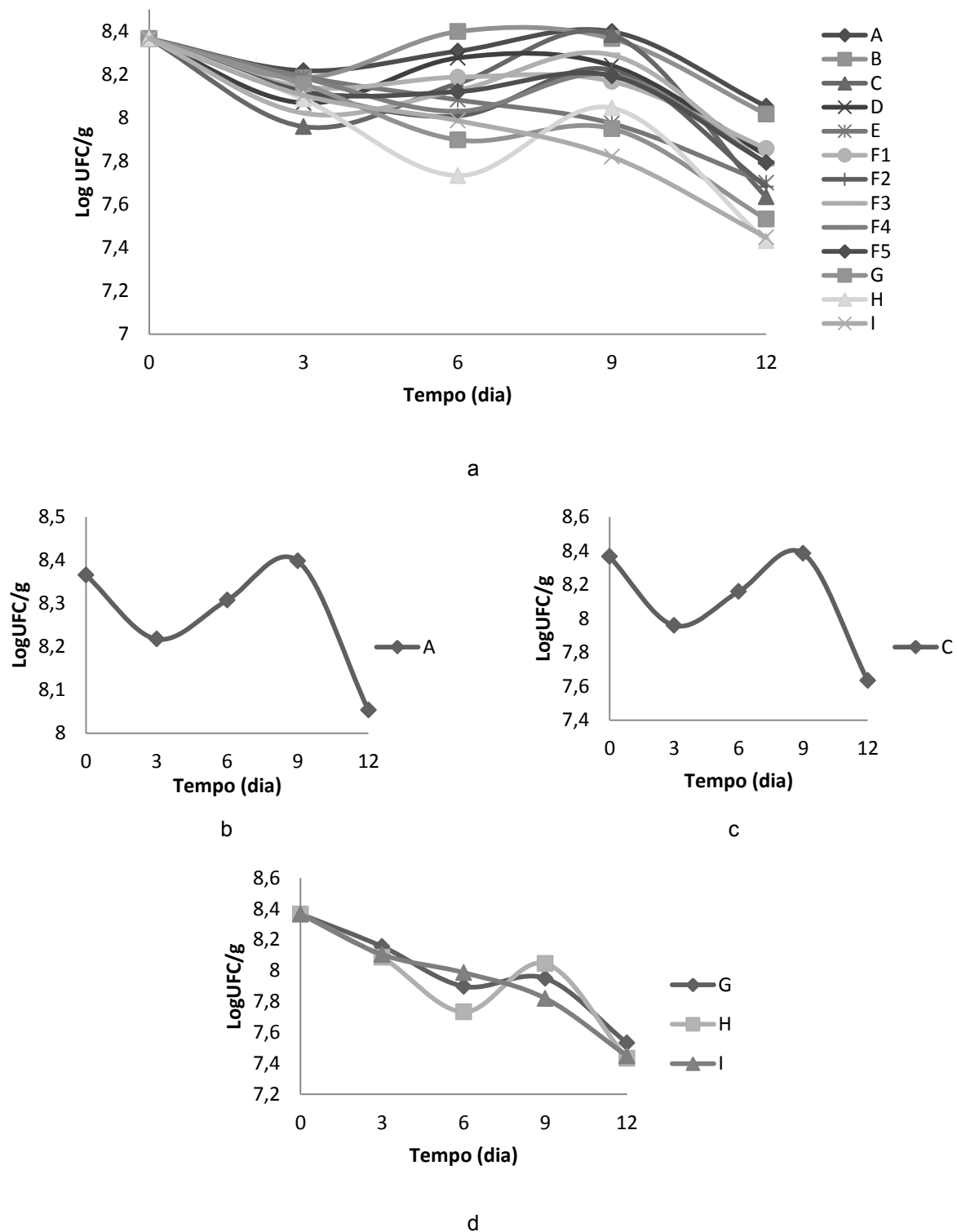


Figura 5. Contagem Log UFC/g da microbiota endógena em muçarela fatiada em contato com os filmes ativos em relação ao tempo de armazenamento (a) Todos os tratamentos com repetição no ponto central; (A) MMT0%NAT0%, (B) MMT0%NAT2%, (C) MMT0%NAT5%, (D) MMT1%NAT0%, (E) MMT3%NAT0%; (F1 a F5) MMT1%NAT2%. (b) MMT0%NAT0% (A); (c) MMT0%NAT5% (C) e (d) MMT1%NAT5% (G), MMT3%NAT2% (H) e MMT3%NAT5% (I).

A avaliação do pH e umidade da muçarela fatiada estão representados na Tabela 5, os valores são expressos pela inclinação da curva.

Tabela 5. Inclinação da curva de pH, umidade e crescimento microbiológico.

Tratamentos	pH	Umidade (%)
A	13,33	0,675
B	7,69	0,785
C	7,23	0,549
D	7,75	0,586
E	7,11	0,491
F1	7,86	0,316
F2	7,01	0,369
F3	7,81	0,439
F4	7,39	0,359
F5	7,07	0,557
G	10,22	0,530
H	6,85	0,464
I	8,04	0,422

Ocorreu o aumento do pH da muçarela fatiada em todos tratamentos. A muçarela embalada com tratamento A (MMT0%NAT0%) obteve a maior inclinação da curva, o pH variou de 5,7 a 6,39 e o queijo em contato com tratamento H (MMT1%NAT5%) obteve a menor inclinação da curva, variando o pH de 5,7 a 6,81 durante os 12 dias de armazenamento. Em média, o queijo muçarela recém produzido apresenta pH na faixa de 5,1 a 5,3, quando fabricado com fermento, e 6,1 a 6,3 quando usa ácido láctico em sua produção (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994; BRASIL, 1997; SILVA, 2005;).

Um fator que pode ter ajudado no aumento do valor do pH, é que o pH foi ajustado para 8 no desenvolvimento dos filmes, o que pode ter favorecido um aumento do pH encontrado nas fatias de muçarela. O pH, a atividade de água e umidade, são fatores que afetam o crescimento microbiano durante o armazenamento de queijos (PITT e HOCKING, 2009). Além disso, a atividade de água promove a liberação do composto antimicrobiano nos filmes, principalmente de filmes com materiais hidrofílicos que são altamente influenciados pela umidade do ambiente (BALAGUER *et al.*, 2013).

Os tratamentos A (MMT0%NAT0%) e B (MMT0%NAT2%) apresentaram maior inclinação da curva de umidade que variou de 59% a 77% e 59% a 70%, respectivamente. Durante os 12 dias de armazenamento, o queijo muçarela pode

ser considerado de média (36 a 45,9%), alta (46 a 54,9%) ou muito alta (não inferior a 55%) umidade (BRASIL, 1996; BRASIL, 1997b). O aumento da umidade pode ser influenciada pela aplicação do filme, que tem sua natureza hidrofílica, e em condições de alta umidade pode dissolver-se.

Filmes biodegradáveis resistentes à água são desejáveis quando se utiliza alimentos com média ou alta umidade. Se o filme possui baixa resistência à água, este irá dissolver-se rapidamente perdendo assim seu agente ativo, reduzindo possivelmente sua ação e, conseqüentemente levando ao aumento da umidade e atividade de água do alimento (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002; AZEVEDO, 2013). No entanto, é importante ressaltar que apesar dos queijos em contato com os outros tratamentos, apresentarem menor inclinação da curva, obtiveram uma faixa de 59 a 69% de umidade, principalmente os tratamentos no ponto central F (MMT1%NAT2%) e os tratamentos contendo 3% de MMT.

Esse resultado pode indicar que a interação dos fatores favoreceu a redução da umidade em relação aos tratamentos que obtiveram maior umidade. Esse fato pode ser devido à presença de fortes ligações intermoleculares (ligações de dissulfeto) entre as moléculas de proteína no interior da matriz polimérica de filmes de IPS. Além disso, a adição do MMT à matriz do filme leva à redução da solubilidade devido interação da matriz de IPS e MMT (RAMOS *et al.*, 2012).

4. CONCLUSÃO

A espessura dos filmes desenvolvidos não foi afetada pela adição da argila montmorilonita.

A taxa de permeabilidade ao vapor d'água aumentou nos tratamentos com adição dos fatores aplicados isoladamente e diminuiu com a ausência e na combinação dos dois fatores.

Pela primeira vez foi relatada a inibição de *C. neoformans* utilizando natamicina em filmes biodegradáveis no teste de difusão em ágar. Houve também inibição de *S. cerevisiae*, e microbiota endógena do queijo muçarela.

Durante 12 dias de armazenamento houve redução de um ciclo log da microbiota endógena da muçarela fatiada, aumentando a vida de prateleira do produto, porém houve aumento do pH e umidade em todas as fatias de muçarela em contato com os tratamentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of American Society for Testing Materials**. ASTM E 96/E 96M-05 - Philadelphia. 2005.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). Mudança de hábitos alimentares no Brasil abre espaço para consumo de queijos http://www.abiq.com.br/associados_mercado_diversos2015_3.asp. Acesso em junho de 2015.

AZEVEDO, V. M. **Desenvolvimento de nanocompósitos de isolado protéico de soro de leite incorporados com agente antiescurecimento**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 92. 2013.

AZEVEDO, V. M., DIAS, M.V., BORGES, S.V., COSTA, A. L. R., SILVA, E.K., MEDEIROS, E.A.A., SOARES, N. F. F. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p.179-188. 2015.

BALAGUER, M.P., CERISUELO, J.P., GAVARA, R., HERNANDEZ-MUÑOZ, P. Mass transport properties of gliadin films: effect of cross-linking degree, relative humidity, and temperature. **Journal Membrane Science**, v. 428, p. 380–392. 2013.

BALAGUER, M. P., FAJARDO, P., GARTNER, H., GOMEZ-ESTACA, J., GAVARA, R., ALMENAR, E., HERNANDEZ-MUNOZ, P. Functional properties and antifungal activity of films based on gliadins containing cinnamaldehyde and natamycin. **International Journal of Food Microbiology**, v.173, p. 62–71. 2014.

BASTARRACHEA, L., DHAWAN, S., SABLANI, S.S. Engineering properties o polymeric based antimicrobial films for food packaging, **Food Engineering Reviews**. v. 3, p. 79-93. 2011.

BIERHALZ, K.C.A., DA SILVA, A.M., KIECKBUSCH, T.G. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p.18-25. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 (1), de 7 de março de 1996. **Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos** – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. **Aprovar o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela)**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1, p. 19694-19695.

BRUSTOLIN, J. C. **Uso de natamicina no controle do desenvolvimento de fungos em salame tipo italiano**. Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de

Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.51, 2011.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 81, 2009.

CAMPOS, C.A., GERSCHENSON, L.N., FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity, **Food and Bioprocess Technology**. v. 4, p. 849–875. 2011.

CHEN, G.-Q., LU, F.-P., DU, L.-X. Natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus* based on statistical optimization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5057–5061. 2008.

DELVES-BROUGHTON, J., THOMAS, L.V., DOAN, C.H., DAVIDSON, P.M. Natamycin, **Antimicrobials in Food**, p. 275–289. 2005.

DE OLIVEIRA, T.M., DE FÁTIMA FERREIRA SOARES, N., PEREIRA, R.M., DE FREITAS FRAGA, K. Development and evaluation of antimicrobial natamycin incorporated film in gorgonzola cheese conservation. **Packaging Technology Science**, v. 20, p. 147–153. 2007.

FAJARDO, P., MARTINS, J.T., FUCINOS, C., PASTRANA, L., TEXEIRA, J.A., VICENTE, A.A. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 349-356. 2010.

GEMILI, S., YEMENICIOGLU, A., ALTINKAYA, S.A. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme, **Journal of Food Engineering**. v. 90, p. 453–462. 2009.

HAIR Jr, J. F., BLACK, W, C., BABIN, B. J., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L. **Análise Multivariada de Dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**. v. 54, p. 56-65. 2000.

HANUSOVÁ, K., ST'ASTNÁ, M., VOTAVOVÁ, L., KLAUDISOVÁ, K., DOBIÁŠ, J., VOLDRICH, M., *et al.* Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p.491- 496. 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1:b Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4. ed. Sao Paulo: IMESP, p. 98-99. 2008.

KOKOSZKA, S. *et al.* Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 53–60, 2010.

KRAUSE BIERHALZ, A.C., DA SILVA, M.A., KIECKBUSCH, T.G. Natamycin release from alginate/ pectin films for food packaging applications. **Journal Food Engineering**, v.110, p. 18–25. 2012.

KRISTO, E., KOUTSOUMANIS, K., & BILIADERIS, C. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, 22, 373 e 386. 2008.

KUMAR, P., SANDEEP, K. P., ALAVI, S., TRUONG, V. D., & GORGA, R. E. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 480–489. 2010.

LI, X. **A simulation evaluation of backward elimination and stepwise variable selection in regression analysis**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Estatística – Faculdade de Artes e Ciências – Universidade do Estado do Kansas, Manhattan. 2012.

LI, Y. *et al.* Fabrication and characterization of TiO₂/whey protein isolate nanocomposite film. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1098-1104, 2011.

LUNA, R. O. *et al.* **Coliformes em queijo tipo mussarela fatiado comercializado em supermercados do distrito sanitário IV do Recife-PE**. Recife-PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2009. Disponível em: [http://www.eventosufrpe.com.br/jepex 2009/cd/ resumos/R1386-1. pdf](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex%202009/cd/resumos/R1386-1.pdf). Acesso em: 25 de maio de 2015.

MCHUGH, T. H., KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 416–423, 1994.

NING, W. *et al.* Effect of citric acid and processing on the performance of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 76, p. 68–73, 2009.

OLLÉ RESA, C., GERSCHENSON, L., & JAGUS, R. Effect of natamycin on physical properties of starch edible films and their effect on *Saccharomyces cerevisiae* activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 3124-3133. 2013.

OLLÉ RESA, C.P., GERSCHENSON, L. N., JAGUS, R. J. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. **Food Control**, v. 44, p.146-151. 2014.

PEREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; RIO, M. A. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrated-based edible coatings. **Postharvest biology and technology**, p. 84-92. 2006.

PIETROWSKI, G. A. M. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de ponta grossa, Paraná. **Revista Brasileira Tecnológica Agroindustrial**, Paraná, v. 2, p. 25-31. 2008.

PINTADO, M.B.S.C., FERREIRA, A.S.S.M., SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, p. 240-246. 2010.

PIRES, A.C.D., SOARES, N.D.F., DE ANDRADE, N.J., DO SILVA, L.H.M., CAMILLOTO, G.P., BERNARDES, P.C. Development and evaluation of active

packaging for sliced mozzarella preservation. **Packaging Technology Science**, v. 21, p. 375–383. 2008.

PRANOTO, Y., RAKSHIT, S.K., SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin, **LWT – Food Science and Technology**, v. 38, p.859–865. 2005.

PITT, J.I., HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*, Third ed. Springer, New York. Raab,W., 1972. *Natamycin (Pimaricin): Its Properties and Possibilities in Medicine*. **Georg Thieme Publishers**, Stuttgart, Germany. 2009.

RAMOS, O.L., PEREIRA, J.O., SILVA, S.I., FERNANDES, J.C., FRANCO, M.I., LOPES DA SILVA, J.A., PINTADO, M.E., MALCATA, F.X. Evaluation of antimicrobial coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf-life of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6282-6292. 2012.

RAY, S. S. & OKAMOTO, M. Biodegradable polylactide and its nanocomposites: Opening a new dimension for plastics and composites. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 24, p. 815–840, 2003.

SALMIERI, S., LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone- based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 10205–10214, 2006.

SILVA, F, T. *Agricultura familiar: Queijo Mussarela*. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, p. 11. 2005.

SOTHORNVIT, R., HONG, S. I., AN, D. J., & RHIM, J. W. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 279–284. 2010.

SCOT. **Aumento do consumo de queijo no Brasil**. Carta leite, ano 6. Ed.105. Disponível em: http://www.bovinos.ufpr.br/100921_Aumenta_o_consumo_de_queijo_no_brasil_def.pdf. Acesso junho de 2015. 2010.

THOMAS, L.V., DELVES-BROUGHTON, J. Natamycin. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Eds.), **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 4109-4115. 2003.

TÜRE, H., EROGLU, E., ÖZEN, B., SOYER, F. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43. p. 2026–2032. 2008.

ZHOU, J. J., WANG, S. Y., & GUNASEKARAN, S. Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 50–55. 2009.

CONCLUSÃO GERAL

- Adição de MMT aumentou a estabilidade térmica dos nanocompósitos.
- Não foi possível observar esfoliação do MMT nos filmes desenvolvidos.
- As propriedades mecânicas foram afetadas pela adição de natamicina.
- A adição de argila montmorilonita provocou pequenas alterações das propriedades ópticas sem afetar a aparência dos filmes.
- Bolhas foram observadas nos filmes nanocompositos e cristais de natamicina e argila montmorilonita foram formados.
- Na espectroscopia no infravermelho foi possível observar através dos picos que houve interação com a natamicina, argila montmorilonita e isolado protéico de soro.
- Os filmes na ausência de argila montmorilonita e natamicina apresentaram menor taxa permeabilidade ao vapor de água.
- O filme ativo inibiu todos os micro-organismos estudados no teste de difusão em ágar.
- Pela primeira vez foi relatada a ação da natamicina na inibição de *Cryptococcus neoformans*.
- Houve a redução de um ciclo log na microbiota endógena da muçarela fatiada embalada com os filmes ativos incorporados com MMT e NAT permitindo o aumento na vida de prateleira do queijo muçarela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPENDINI, P. e HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, p. 113-126. 2002.

AZEREDO H. M. C. **Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial da aplicação**. Boletim do CEPPA, v. 21, p. 267-78. 2003.

BARRETO, P. L. M., PIRES, A. T. N., SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 147-152. 2003.

CHO, I. J., LEE, H. S., LIM, S. J., KOH, J. Y., KWAK, S. H., & HWANG, G. I. Detection and distribution of food-borne bacteria in ready-to-eat foods in Korea. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, p. 525-529. 2011.

COLLISTER, J. Commercialisation of polymer nanocomposites. In R. KRISHNAMOORTI & R. A. VAIA (Eds.), **Polymer nanocomposites**: Synthesis, characterisation and modelling. Washington: American Chemical Society, 2002.

DAVANÇO, T., TANADA, P. 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**, Campinas, v. 27, p. 408-416. 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Produção, industrialização e comercialização. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao.php>. Acesso em: 19 fev. 2015.

ESPITIA, J. P. P., SOARES, D. F. F. N., COIMBRA, S. D. R. J., ANDRADE, J. D. N., CRUZ, S. R., & MEDEIROS, A. A. E. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1447-1464. 2012.

EVANGELISTA, L. Queijo Mussarela - Evolução tecnológica. **Revista Mais Leite**. 2011. <http://www.cienciadoleite.com.br/?action=1&type=0&a=559>. Acesso em: 20 de junho de 2015.

FOEGEDING, E. A. *et al.* Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 151-159. 2002.

HERSHKO, V., NUSSINOVITCH, A. Physical properties of alginate-coated onion (*Allium cepa*) skin. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 195-202. 1998.

KOH, H. C., PARK, J. S., JEONG, M. A., HWANG, H. Y., HONG, Y. T., HA, S. Y., NAM S.Y. Preparation and gas permeation properties of biodegradable polymer/layered silicate nanocomposite membranes. **Desalination**, v. 233, p. 201-209. 2008.

LAGARON, J. M., CABEDO, L., CAVA, D., FEIJOO, J. L., GAVARA, R., GIMENEZ, E. Improving packaged food quality and safety part 2: nanocomposites. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 994-998. 2005.

LOTTI, C., ISAAC, C. S., BRANCIFORTI, M. C., ALVES, R. M. V., LIBERMAN, S., BRETAS, R. E. S. Rheological, mechanical and transport properties of blown films of high density polyethylene nanocomposites. **European Polymer Journal**, v. 44, p.1346–1357. 2008.

PAIVA, L. B., MORALES, A. R., GUIMARÃES, T. R. Propriedades Mecânicas de Nanocompósitos de Polipropileno e Montmorilonita Organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos. v. 16, p.136-140. 2006.

PATIL, N. V. Nanoclays Make Polymers Stronger. **Advanced Materials & Processes**, v, 163, p. 39-49. 2005.

PORTA, R. *et al.* Transglutaminase crosslinked pectin and chitosan-based edible films: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 223-238. 2011.

RAY, S., EASTEAL, A., QUEK, S. Y., CHEN, X. D. The potential use of polymer-clay nanocomposites in food packaging. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, art. 5. 2006.

ROTTA, J. **Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 105. 2008.

SADAKA, F., NGUIMJEU, C., HÉLÈNE BRACHAIS, C., VROMAN, I., TIGHZERT, L., COUVERCELLE, J. Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 350. 2014.

SOARES, N.F.F., PIRES, A.C.S., CAMILLOTO, G.P., SILVA, P.S., ESPITIA, P.J.P., SILVA, W.A. Recent patents on active packaging for food application. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 1, p. 171-178. 2009.

SORRENTINO, A., GORRASI, G., VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 84–95. 2007.

SUNG, S., SIN, L., TEE, T.; BEE, S., RAHMAT, A. R., RAHMAN, W., TAN, A., VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, p.110-123. 2013.

WANG, S. F. *et al.* Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 123–131. 2005.

YOSHIDA, C. M. P., ANTUNES, A. J. **Aplicação de filmes protéicos à base de soro de leite**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 420-430. 2009.