



Biofilme de gelatina e glicerol com propriedade antibacteriana ***Biofilm of gelatin and glycerol with antibacterial properties***

Inácio de Sá Leite^{1*}, Leonardo de Araújo Silva², Wilson Rodrigues Pinto Júnior³

¹Aluno do Programa de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia– UFBA, campus Anísio Teixeira, BA

²Pesquisador, IMS-CAT, Universidade Federal da Bahia– UFBA, campus Anísio Teixeira, BA

³Professor do Programa de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal Bahia– UFBA, campus Anísio Teixeira, BA

*Autor para correspondência, E-mail: inacio.saleite@gmail.com

Received: 24 September 2019 / Accepted: 27 October 2019 / Published online: 28 January 2020

Resumo: O interesse por embalagens biodegradáveis tais como os bioplásticos está aumentando porque o uso de materiais e recursos renováveis contribui para a preservação ambiental. Entre todos os biopolímeros, a gelatina está sendo pesquisada como um material com grande potencial para elaboração de filmes biodegradáveis. O objetivo deste estudo foi a elaboração de um biofilme de gelatina e glicerol com propriedade antibacteriana. O bioplástico formulado na proporção 1:1 (16% de gelatina e 16% de glicerol) apresentou aspecto homogêneo, transparente, com ausência de bolhas na superfície e boa flexibilidade (facilidade de manuseio e ausência de rupturas e zonas quebradiças). O filme apresentou total solubilidade em ácido clorídrico 1N e a análise de biodegradabilidade indicou uma perda de massa total durante 30 dias enterrados no solo. A solução de íons de prata teve um efeito bactericida, com base na concentração inibitória mínima (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL) testada, frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922. Esse efeito continuou presente quando os íons de prata (1 mg/mL) foram adicionados no biofilme, visto que para todos os filmes testados foram observados halos de inibição maiores ou iguais a 30 mm. Os resultados apontam perspectivas da utilização do biofilme formulado a base de gelatina com adição de íons de prata na categoria de embalagens ativas.

Palavras chave: Biofilme, embalagem ativa, gelatina, íons de prata.

Abstract: *The interest for biodegradable packaging, such as bioplastics, is increasing, for the use of environment friendly material and renewable resources contribute to environment preservation. Among the biopolymers, gelatin is being researched as a great candidate on biodegradable film development. This study's goal is the preparation of a biofilm of gelatin and glycerol with antibacterial properties. The bioplastic formulated on 1:1 proportion (16g of gelatin and 16g of glycerol) showed an aspect of homogeneity, transparency and lack of bubbles on the surface, besides good flexibility (handling ease and lack of ruptures or brittle areas). The film showed full solubility in chloric acid 1N and the biodegradability analysis showed a 100% mass loss within 30 days buried underground. The silver ion solution had an antibacterial effect, based on the minimal tested inhibitory concentration (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL) for the micro-organism *Escherichia coli* ATCC 25922. That effect remained present when the silver ions (1mg/mL) were added to the biofilm, as for every film tested there were 30mm inhibition haloes or bigger. The results point out to different perspectives for uses of the biofilm, made from gelatin with the addition of silver particles on the category of active packaging material.*

Keywords: Biofilm, active packaging, gelatin, silver ion.

1. Introdução

O plástico é um dos materiais mais utilizados no século XXI (Piatti, 2005). Materiais plásticos estão presentes no dia a dia de cada pessoa, como utensílios domésticos, tecnologia, brinquedos e produtos médicos. Essa expansão e diversidade no uso de plásticos devem-se à conveniência que eles fornecem e o baixo preço comparado a outros materiais. Esses são obtidos a partir de nafta, que é um subproduto da refinação de petróleo, usado em larga escala na indústria petroquímica (Piatti, 2005; Queiroz *et al.*, 2017). No entanto, as mesmas qualidades que favorecem o seu uso intenso, também são as mesmas que

influenciam o seu acúmulo no meio ambiente. O descarte de maneira indiscriminada é cada dia maior, tendo como agravante as vias de obtenção, realizadas através de fonte não renovável (Sasaki, 2019). A preocupação ambiental que vem sendo apontada ao longo dos últimos anos tem mostrado a potencialidade dos recursos renováveis em gerar novos materiais competitivos aos de origem petroquímica (Gomes, 2017).

Nessa perspectiva, a produção de um bioplástico à base de matéria prima natural é uma alternativa viável para produção de embalagens e o uso de colágeno (gelatina) pode ser promissor para formação de um biopolímero. Todavia, é necessário o uso de plastificantes, ou seja, aditivos que proporcionam mobilidade molecular e flexibilidade dos filmes em função da interação com as cadeias moleculares. O glicerol é um dos plastificantes mais utilizados na produção de filmes biodegradáveis (Garcia, 2016).

As proteínas são polímeros termoplásticos, constituídos por grupos polares e apolares. Normalmente são compostos insolúveis, principalmente as proteínas fibrosas como o colágeno. Para o desenvolvimento de biofilmes, as proteínas são utilizadas em sua forma natural e os filmes geralmente são desenvolvidos através do processo termoplástico, que consiste na mistura de proteínas e plastificantes (Vroman e Tighzert, 2009). A gelatina é uma proteína de origem animal, derivada do colágeno e apresenta a propriedade de formar géis termorreversíveis após ser aquecida, solubilizada e resfriada. O mecanismo de formação envolve interligações iônicas entre grupos amino e carboxil dos aminoácidos, com a ajuda de pontes de hidrogênio (Kester e Fennema, 1986)

O glicerol é um composto com baixa massa molar e vem sendo amplamente utilizado no processamento termoplástico de proteínas. Seu alto efeito plastificante é atribuído à facilidade que o glicerol tem de se inserir e posicionar-se na rede proteica tridimensional, essa característica aumenta a hidrofiliabilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes plastificados (Silva, 2017).

A adição de compostos antibacterianos em um biopolímero é possível para a produção de um bioplástico com mais aceitação na atualidade, chamado de embalagem ativa. Este invólucro é uma embalagem planejada que influencia ativamente no produto e possui agentes aditivos que interagem com o produto de forma desejável, tendo como propósito proteger, prolongar a vida de prateleira, preservar as propriedades sensoriais (aparência, aroma, consistência, textura e flavor), além de manter a qualidade, a integridade do produto e garantir a segurança do alimento (Braga, 2017).

Nanopartículas de prata (AgNP) tem tido grande atenção e emergido como principal produto do campo na nanotecnologia. O uso de nanopartículas tem ganhado impulso na atualidade pelo fato de possuírem propriedades bactericidas, químicas, ópticas e mecânicas interessantes (Vaidyanathan *et al.*, 2010). Estas propriedades têm conduzido amplas aplicações de nanopartículas de prata, tais como antibacterianos têxteis e polímeros contendo nanopartículas de prata usados para fabricação de refrigeradores, lavadoras de louças, filmes plásticos, tábuas de corte, garrafas, baldes de plástico e vasilhames (Guzmán *et al.*, 2009; Zielinska *et al.*, 2009).

Na indústria alimentar, algumas alternativas podem ser aplicadas como aditivo nas embalagens ativas, entre elas estão as nanopartículas de prata (AgNPs) que são agregados de átomos de prata que variam de diâmetro e apresentam diferenças em relação às propriedades da prata metálica. A prata localiza-se no bloco *d* da Tabela Periódica (metal de transição), grupo 11, período 5 ($4d^{10}5s^1$). Possui cor prateada, é brilhante, maleável, dúctil e apresenta ótima condutividade elétrica. É pouco reativa e bastante resistente à corrosão (Duarte, 2013). Estas possuem propriedades biológicas importantes. Alguns exemplos são a atividade antiviral (Orlowski *et al.*, 2014), atividade antifúngica (Kim *et al.*, 2009). Além disso, apresenta as atividades anti-inflamatória (Yilma *et al.*, 2013), citotóxica (Gurunathan *et al.*, 2013) e antiangiogênica (Baharara *et al.*, 2014), biossensores e catalisadores (Siddiqi e Husen, 2016). Neste sentido o trabalho teve como objetivo a produção de uma embalagem biodegradável com a adição dos íons de prata como composto antibacteriano.

2. Metodologia

2.1 Elaboração do bioplástico

Os biofilmes foram produzidos em diferentes concentrações de gelatina, glicerol e água destilada, conforme descrito na Tabela 1.

Os bioplásticos foram preparados segundo a metodologia descrita por Biscarat *et al.* (2015), com adaptações. O procedimento iniciou-se pela dissolução da gelatina (Dr. Oetker), em uma solução contendo glicerol como plastificante e água destilada utilizando agitador magnético com aquecimento, no qual a solução era aquecida à aproximadamente 65 °C durante 5 min. Após a dissolução, as soluções firmogênica

(10 mL) foram vertidas em placa de Petri (10x10 cm), que eram acondicionadas em estufa á 25 °C por 24 horas. Em seguida, os filmes foram desenhados e utilizados nos ensaios.

Tabela 1. Componentes para produção do bioplásticos.

Ensaio	Proporção, m/v	Gelatina, %	Glicerol, %	Água, ml
A1	1:1	16	16	120
A2	1:4	16	64	120
A3	4:1	64	16	120
A4	1:6	6	42	120
A5	6:1	42	6	120

*Os ensaios foram preparados em três repetições em triplicata (Nove vezes).

2.2 Aspectos visuais

Análises tácteis e visuais foram realizadas a fim de verificar diferenças entre os revestimentos biopoliméricos, bem como a homogeneidade (distribuição uniforme sem partículas insolúveis ou regiões sem recobrimento), flexibilidade (manuseio fácil, sem rachaduras e áreas frágeis) e ausência de defeitos aparentes como bolhas de ar na superfície, desprendimento do revestimento, olho de peixe (massa globular pequena que não se misturou completamente ao material do filme) e coloração, seguindo os critérios adotados por (Cruz, 2018), com modificações.

2.3 Determinação da solubilidade em ácido

A solubilidade em ácido foi determinada segundo o método proposto por (Gontard *et al.*, 1992), os filmes foram recortados em discos de 2 cm² de diâmetro. A massa seca inicial das amostras foi obtida após secagem das mesmas, por um período de 24 horas à temperatura de 105 °C, em estufa, após a obtenção da massa seca, as amostras foram submersas em um recipiente contendo solução de ácido clorídrico 1N por 24 horas. Após esse período, as amostras foram secadas e pesadas para obtenção da massa final. As análises foram realizadas em triplicata (Fakhouri, 2009).

2.4 Biodegradabilidade

O estudo da biodegradabilidade foi estimado pela a perda de massa dos biofilmes no solo para isso, as amostras de 2 cm² do filme foram misturadas com o solo não padronizado. Após a mistura com o solo as amostras foram acondicionadas em frasco de vidro sem oxigenação, com 10 centímetros de largura 15 centímetros de comprimento, em seguida os bioplásticos foram enterrados a 20 cm de profundidade do solo. Os recipientes foram retirados nos períodos 30, 60, 90, 120 dias após serem enterrados no solo. Os polímeros foram lavados em solução NaOH 12% para retiradas das frações de argilas aderidas na superfície dos filmes. Os polímeros foram colocados em estufa a 65 °C por 48 horas, e posteriormente as amostras foram retiradas e pesadas para avaliar a perda de massas e comparar com o valor da massa determinada antes de enterrar os biofilmes. As análises foram realizadas em triplicata (Souza *et al.*, 2016).

2.5 Avaliação antibacteriana do biofilme com adição de íons de prata

2.5.1 Preparo da solução de íons de prata

A concentração de 1000 mg. L⁻¹ de íons de prata foi preparada utilizando nitrato de prata (AgNO₃) 0,001M, ácido gálico 0,1%, e hidróxido de sódio 1M. Em um erlenmeyer foi dissolvido em 0,017 g de nitrato de prata em 100 mL de água destilada, posteriormente foi adicionado 0,01 g de ácido gálico, a solução então foi agitada com agitador magnético e o pH da solução foi ajustado para 14 com uma solução de hidróxido de sódio 1M, com auxílio do pHmetro (Quimis). A solução final foi envolvida com papel alumínio, evitando o contato com a luminosidade (Oliveira, 2013). A solução de íons de prata foi encaminhada para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922, o melhor efeito inibitório foi utilizado para a formulação do biofilme.

2.5.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima dos íons de prata

O ensaio foi realizado por meio do teste de microdiluição, a partir de uma solução-mãe (1000 mg/L) de íons de prata. Foram realizadas três concentrações, por diluição à razão 2, com água destilada estéril, seguindo protocolo descrito por (Esmerino *et al.*, 2004), com modificações. O preparo do inóculo foi conduzido com a cepa de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), obtida da biblioteca da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A cepa liofilizada foi ativada de acordo com as instruções do fabricante (FIOCRUZ, Brasil). O crescimento da cepa foi realizado em tubo com 40 mL de Caldo Nutriente (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) em estufa a 35 °C por 24 horas.

A concentração do inóculo foi padronizada em solução de água peptonada 0,1% estéril, comparando a turbidez obtida com o padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro a 660 nm. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, o que equivale a uma densidade celular de 1 a 3×10^8 UFC.mL⁻¹ (United States Pharmacopeial, 1990; NCCLS, 2002). A partir dessa suspensão, foi preparado o ágar-inóculo em uma proporção de 1,0 mL da suspensão bacteriana para 100 mL do meio ágar Mueller-Hinton (Kasvi. São José do Pinhais, Brasil), ainda no estado líquido, a uma temperatura em que os microrganismos pudessem permanecer vivos quando em contato com o meio ágar (45 - 50 °C). Em cada placa foram adicionados 20 mL do ágar-inóculo, ficando em repouso por 5 minutos para solidificação. Após sua solidificação, foram posicionadas as peças de polipropileno (10 mm de altura; diâmetros interno e externo de 6 e 8 mm, respectivamente, previamente lavadas e esterilizadas em autoclave a 120 °C por 15 minutos), para uma melhor estabilidade e absorção da solução de íons de prata sobre o ágar. As peças foram adicionadas a uma distância de aproximadamente 20 mm um do outro e repousadas por 5 minutos. Posteriormente, foram inoculadas 100 µL do íons de prata no interior de cada peça, em diluições seriadas (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL), tendo como base a solução-mãe. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 24 horas, e posteriormente foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) com base na mensuração do diâmetro do halo de inibição, em milímetros. O ensaio foi realizado em triplicata. A concentração que apresentou o melhor resultado foi utilizada para preparação do biofilme com os íons de prata.

2.5.2 Determinação da atividade antimicrobiana do biofilme por disco-difusão

O filme contendo íons de prata foi preparado seguindo o mesmo procedimento adotado para a produção dos filmes de gelatina e glicerol, conforme descrito no item 2.1, vale ressaltar que 1 mL da solução de íons de prata (solução-mãe 1000mg/L) foi adicionado a solução formadora de filme após a reação de plastificação, sob agitação à 65 °C. Esse filme foi produzido na proporção de 1:1 de gelatina e glicerol.

A metodologia de disco-difusão foi realizada de acordo com as instruções da (Eucast, 2017), com modificações. A padronização do microrganismo *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) utilizado no ensaio antibacteriano ocorreu conforme o protocolo descrito na subseção § 2.5.1.1. A suspensão bacteriana foi homogeneizada e 0,1 mL foram espalhados em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Kasvi. São José do Pinhais, Brasil) previamente preparado e solidificado. Após a dispersão da solução bacteriana das placas com ágar, uma amostra circular com 2 cm² de diâmetro do filme foi colocado no centro de cada placa, em seguida as placas foram encubadas em estufa à 30 °C por 24 horas. Posteriormente foi realizada a mensuração do diâmetro do halo de inibição, em milímetros. Os ensaios foram realizados em triplicata, seguindo especificações de Eucast (2017), com modificações.

3. Resultados e discussão

A síntese dos biofilmes é relativamente simples, pois não se utilizou solvente e pode-se conduzir na temperatura de trabalho de 65 °C o que não promove risco de queimaduras. A mistura da gelatina com glicerol na proporção 1:1 em massa apresentou um desempenho cinético adequado ao processamento, ou seja, tempo para verter toda a solução firmogênica em um molde. O biofilme A1 (Tabela 1) estava visualmente homogêneo, transparente, sem aspecto de olho de peixe, com ausência de bolhas na superfície e boa flexibilidade (facilidade de manuseio e ausência de rupturas e zonas quebradiças). O Biopolímero foi desprendido da placa Petri com facilidade, na temperatura de armazenamento utilizada para secagem (25 °C), e não apresentou aspecto pegajoso ao final. Os aspectos encontrados corroboram com a afirmação de (Cruz *et al.*, 2018) em que filmes a base de gelatina são transparentes e homogêneos.

A coloração dos biofilmes teve sua dependência com base na concentração de gelatina e glicerol adicionada nas formulações (Tabela 1). O aumento na concentração de gelatina fez com que os filmes

perdessem o seu aspecto transparente e assumissem uma coloração amarelada (Figura 1). Para a elaboração de bioplásticos que visam utilização como embalagens ou ainda como coberturas para alimentos, uma maior transparência, como a encontrada no biofilme A1, tende a ser melhor, visto que o consumidor passa a ter conhecimento sobre características relevantes do produto a ser adquirido, como exemplo a cor (Cruz *et al.*, 2018). Tendo isso como base todos os testes foram realizados com o biofilme A1, pois apresentou as melhores características para um biofilme.

Em geral, filmes formulados com gelatina apresentam boas flexibilidades Zhao *et al.* (2008), como o alcançado no presente trabalho com o bioplástico A1. Este efeito foi comprovado por (Joly-Duhamel *et al.*, 2002), ao observarem que ligações físicas cruzadas que ocorrem devido as interações intermoleculares durante o resfriamento auxiliam no estabelecimento da rede do gel. Lajarim (2014) demonstrou também que o uso da gelatina influencia no comportamento dos géis, fortalecendo a rede dos mesmos. No entanto, filmes biopoliméricos obtidos exclusivamente a partir de proteínas apresentam geralmente baixa elasticidade e são quebradiços e a introdução de plastificantes é uma alternativa para conferir uma maior elasticidade ao sistema. Os plastificantes devem ser compatíveis com o biopolímero, a exemplo do glicerol que possuem boa interação com o polímero devido a sua estrutura e seu caráter hidrofílico (Marcilla *et al.*, 2009), para garantir sua eficiência, interagem com a interface do polímero, enfraquecendo as forças intermoleculares, ocasionando maior mobilidade às cadeias formadoras da matriz polimérica e consequentemente, aumentando a flexibilidade dos filmes (Schrooyen *et al.*, 2001).



Figura 1. Filmes formulados com diferentes concentrações de gelatina e glicerol. A1- 16% de gelatina e 16% glicerol; A2 - 16% de gelatina e 64% de glicerol, A3 - 64% de gelatina e 16% de glicerol, A4 - 6% de gelatina e 42% de glicerol, A5 - 42% de gelatina e 6% de glicerol.

O bioplástico A1 apresentou total solubilidade em ácido (100%). Segundo Fakhouri (2009) essa característica é importante em casos em que a embalagem é consumida com o produto final, indicando sua total solubilização no pH ácido do organismo humano durante a digestão. Resultado semelhante a este trabalho também foi obtido por Fakhouri (2009) ao produzir bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina.

O processo de biodegradação de biofilmes é complexo, pois depende da estrutura do polímero, das condições do meio (calor, umidade, radiação e nutrientes) e dos tipos de microrganismos que estão presente no ambiente (Oliveira, 2007). A introdução no solo de um composto contendo C, N ou P pode servir de nutriente e ser assim degradado por catabolismo ou, ainda ser degradado por co-metabolismo (Monteiro, 2001). Na análise de biodegradabilidade, o biofilme A1 teve a perda de massa total durante 30 dias enterrados no solo. Essa rápida decomposição do bioplástico deve-se, provavelmente, à presença de gelatina em sua composição, visto que gelatinas são polímeros biodegradáveis constituídos de proteínas do tipo animal (Chandra, 1998).

Normatizações internacionais (ASTM D6400, ASTM D6868, ASTM D7081 para EUA ou EN 13432 na UE), que deliberam ações sobre compostos com características biodegradáveis, determinam que sua decomposição no solo deva ser comprovada em um nível de biodegradabilidade superior a 90% em menos

de 180 dias. A especificação do tempo necessário para a biodegradação final é um requisito essencial para qualquer reclamação de biodegradabilidade (Agrobiofilm, 2013). Segundo Briassoulis (2007) a taxa de biodegradação aumenta quando a temperatura e umidade são mais elevadas. O oxigênio e a umidade são os fatores que mais afetam o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela biodegradação dos plásticos no solo. Sendo assim, os bioplásticos produzidos com gelatina apresentaram alta degradabilidade (30 dias), comprovando sua viabilidade no uso como embalagem biodegradável. Esse resultado corrobora com os apresentados por (Lucena *et al.*, 2015) em sua avaliação de biodegradabilidade de biofilme à base de xilana e gelatina.

A função antimicrobiana da prata é principalmente atribuída à ação dos íons de prata que interagem negativamente com componentes biomacromoleculares carregados (dissulfeto ou grupos sulfidrilo de enzimas) e ácidos nucleicos, causando mudanças estruturais e deformação nas paredes celulares e membranas das bactérias que levam à ruptura dos processos metabólicos seguida de morte celular (Rhim *et al.*, 2013). O mecanismo antimicrobiano dos íons de prata também tem sido relacionado aos danos à membrana das bactérias devidos aos radicais livres derivados a partir da superfície das partículas (Rhim *et al.*, 2013).

A solução de íons de prata teve o seu pH ajustado de 11 para 14 como auxílio da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. A força do agente redutor influi no diâmetro das nanopartículas de prata (AgNPs), bem como o pH do meio reacional, sendo que quanto mais forte o agente redutor menores são as AgNPs. Estudos relatam que as AgNPs em meios ácidos tendem a formar aglomerados, e conseqüentemente partículas maiores (Sharma *et al.*, 2008; Albernaz, 2014; Bonatto, 2014). O aumento da alcalinidade da solução de íons de prata utilizada no experimento em questão foi obtido com a solução de hidróxido de sódio uma vez que é sabido seu potencial como agente redutor (Lopes, 2017). (Tai *et al.*, 2008) obtiveram AgNPs, com tamanho de partícula menor que 10 nm, ao prepararem um solução de AgNO₃ e amido (agente de cobertura) adicionada NaOH como agente redutor.

Pode-se afirmar que a ligação destas partículas na célula depende da área superficial disponível para a interação. Partículas menores possuem uma área muito maior de superfície disponível para interagir com o microrganismo, sendo, por isso, mais eficazes no combate a este, se comparadas a partículas maiores (Morones *et al.*, 2005). (Berni *et al.*, 2008) observaram uma taxa de redução de microrganismos na faixa de 97,5% e 99,9% correlacionado as variações no tamanho das partículas de prata na ordem de 300 nm e 30 nm, respectivamente. A literatura tem evidenciado que soluções de nitrato de prata em pH 12 tendem a forma de modo rápido nanopartículas com dimensões que variam de 1 a 9 nm, deste modo o trabalho se propôs trabalhar na baixa de pH 14 para ampliar os estudos nessa área.

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) teve como objetivo avaliar a quantidade de íons de prata necessária para que o filme apresentasse atividade antimicrobiana. O efeito da ação antimicrobiana dos íons de prata mostrou-se positivo com base na CIM testada, frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC25922. As concentrações de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL promoveram um efeito inibitório com formação de halos de 60 mm, 30 mm, 20 mm respectivamente, os resultados podem ser analisados na Figura 2.

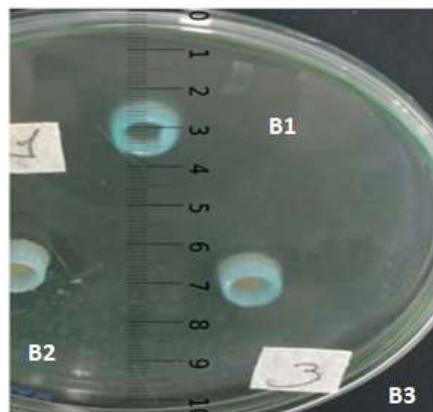


Figura 2. Halo de inibição por difusão em profundidade com solução de íons de prata em diferentes concentrações: B1 - 1 mg/mL; B2 - 0,5 mg/mL e B3 - 0,25 mg/mL, frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC25922 em meio ágar Mueller-Hinton.

A variação da formação de um halo para outro apresentado pelas concentrações diferentes de prata é fortemente defendida através da produção em maior ou menor quantidade de substâncias antimicrobianas, a escala nanométrica da substância é o fator responsável tanto pela propagação quanto pela ação inibitória.

Segundo (Pedrassani, 2014) os íons de prata liberados das partículas durante sua interação com a membrana celular das bactérias podem reagir com os fosfatos presentes nas moléculas do DNA desses microrganismos, de modo a inativar sua replicação, dificultando deste modo o crescimento do inóculo bacteriano no ágar.

Após o preparo da solução de íons de prata o volume de 1 mL foi adicionado ao bioplástico A1, alterando sua cor no processo já que durante a síntese dos íons de prata, etapa de alcalinização da solução, a cor da mistura reacional mudou gradualmente de incolor para rosacé e, posteriormente, a solução tornou-se avermelhada, o que fez com que o filme perdesse o aspecto transparente (Figura 3A) e assumisse uma coloração avermelhada (Figura 3B). Lopes (2017) comprovou que o aspecto avermelhado em solução contendo prata era um indicativo da formação das nanopartículas.



Figura 3. A- Biosplástico formado nas concentrações de 16% de gelatina e 16% glicerol; B- Biosplástico formado nas concentrações de 16% de gelatina e 16% glicerol com adição de íons de prata.

Na Figura 4 são apresentados os resultados obtidos para os ensaios antibacterianos feitos com os biofilmes com adição do aditivo íons de prata, frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados evidenciaram a eficiência da solução dos íons de prata contida nas amostras de 2 cm² do bioplástico como bactericida, visto que para todos os filmes testados foram observados halos de inibição maiores ou iguais a 30 mm. Hubner (2017), por meio do teste de difusão em placas comprovou a atividade antimicrobiana dos filmes de gelatina contendo clinoptilolita impregnado com íons de prata, com formação de halo de inibição de aproximadamente 3 a 4 mm em torno de todos os filmes.

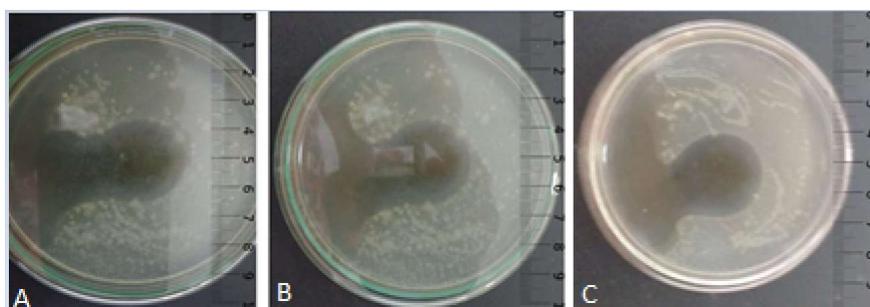


Figura 4. Halo de inibição, em triplicata, por difusão em profundidade, com o biosplástico formulado nas concentrações de 16% de gelatina e 16% glicerol com adição de íons de prata, frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922, em meio ágar Mueller-Hinton.

Apesar dos benefícios atribuídos a utilização das nanopartículas (NPTs) em embalagens alimentícias, estudos relatam que a migração de NPTs para o alimento é variável. Avella *et al.* (2005) estudaram a migração de NPTS em biofilmes adicionados de MMT (Montmorilonita) para o alimento embalado. Os resultados indicaram que ocorreu uma baixa migração de magnésio e ferro para os vegetais embalados, porém, houve uma alta migração de silício, principal componente da nanoargila. Desta forma, verifica-se a importância dos parâmetros toxicológicos e legislativos referentes ao uso destes materiais (Pessanha, 2016).

4. Conclusões

A gelatina mostrou ser uma matéria-prima adequada para produção de bioplásticos biodegradáveis, podendo ter uso industrial pela fácil sintetização. O uso de glicerol como plastificante pode auxiliar no aumento da alongação, homogeneização e estrutura do filme, e teve ação positiva em relação à sua transparência. A solubilidade em ácido foi um fator positivo, pois comprovou a degradação do filme em

ácido similar as condições do sistema digestório humano. A biodegradação do bioplástico foi comprovado pela decomposição do mesmo no período de 30 dias.

O bioplástico formulado, nas concentrações de 16% de gelatina e 16% glicerol, com adição de íons de prata, na concentração 1mg/mL, caracteriza o filme produzido como embalagem ativa, visto que o bioplástico apresentou atividade bactericida satisfatória, pois ao final de 24 horas de ensaio não foi identificado o crescimento de bactérias no ágar, comprovando a ação dos íons de prata presente na embalagem sob o microrganismos *Escherichia coli*. Isto demonstra o potencial gerador de inovação tecnológica que pode ser obtido a partir do trabalho. Entretanto, novas pesquisas são requeridas para ampliar a compressão de suas atividades estáveis e antimicrobianas.

Referências bibliográficas

Agrobiofilm. Program managed by REA – *Research Executive Agency. project was funded by the European Union's Seventh Framework – under the grant agreement number 262257.* 2007-2013.

Albernaz, V. L. Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físico-química, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico. Dissertação de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2014.

Avella, M., De Vlieger, J. J., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., & Volpe, M. G. *Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications.* Food Chemistry, 93(3), 467-474. 2005.

Berni, E; Ribeiro, C; Zucolotto, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Embrapa Instrumentação Agropecuária - Comunicado Técnico, 4p. São Carlos, SP. 2008

Biscarat, J., Bechelany M., Pochat-bohatier C., Miele P. *Graphene-like BN/gelatin nanobiocomposites for gas barrier applications.* Nanoscale. Jan 14;7(2):613-8. doi: 10.1039/c4nr05268d. Epub 2014 Nov 24. 2015.

Bonato, C.; Silva, P. *Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells.* Industrial Crops and Products, v. 58, p. 46-54, 2014.

Braga, L. R.; Silva, F. M. Embalagens ativas: uma nova abordagem para embalagens alimentícias. *Brazilian Journal of Food Research, Campo Mourão, v. 8, n. 4, p. 170-186, out./dez. DOI: 10.3895/rebrapa.v8n4.4062.* 2017.

Briassoulis, D.; Kyrikou, I. *Biodegradation of agricultural plastic filmes: a critical review.* Journal Polymer Environment, v. 15, p. 125-150. DOI: 10.1007/s10924-007-0053-8. 2007

Caro, C.; Catillo, P. M.; Klippsteen, R.; Pozo, D. Zaderenko, A. P. *Silver nanoparticles sensing and imaging applications.* Silver Nanoparticles: In-Tech, 2010.

Chandra, P. K.; Sobral, P. J. A. Cálculo de propriedades viscoelásticas de biofilmes: aplicação de três modelos. *Ciências Tecnologia e Alimentos.* maio/ago. v. 20, n. 2, p. 250-256, 1998.

CLSI. *National Committee for Clinical Laboratory Standards.* Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2.ed. 51p Pennsylvania: NCCLS; 2002.

Cruz, W. F. Aplicação e avaliação de biopolímeros de amido e gelatina como revestimento em materiais de embalagens, Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. p.99 - 100 2018.

Esmerino; L. A.; Gonçalves, L. G.; Scheleski, M. E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. *Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, v. 9, p. 31-9, 2003.*

Eucast. *Disk Diffusion Test Manual The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing v 3.0.* August 16, 2017.

- Fakhouri, F. M. *Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes*. *Postharvest Biology and Technology*, v. 109, p. 57–64, 2015.
- Garcia, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. *Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings*. *Journal of food science*, v. 65, n. 6, p. 941–944, 2016.
- Gomes R. V.; Melo B. N.; Velloso R. M. H. Síntese e caracterização de bioplásticos a partir de glicerol e óleo de mamona. *Latin American Journal of Energy Research – Lajer* v. 4, n. 1, p. 41 – 51, 2017. DOI: 10.21712/lajer.2017.v4.n1.p41-51
- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J. L. *Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology*. *Journal of Food Science*, 57: 190-199, 1992.
- Gurunathan, S.; Han, J.W.; Kwon, D.N.; Kim, J. H. *Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria*. *Nanoscale Res. Lett.* DOI:10.1186/1556-276X-9-373. 2014.
- Hubner, P. Desenvolvimento de filmes de gelatina contendo zeólita clinoptilolita impregnada com íons prata e avaliação das propriedades antimicrobianas. Dissertação de mestrado. Programa de pós- graduação em engenharia química. Escola de Engenharia Química da Universidade do Rio Grande do Sul, Porto alegre. RS. 2017
- Husen, A.; Siddiqi, K. S. *Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application*. *Nano Res Lett*, v. 9, n. 229, 2014.
- Husen, T.; Salahuddin, S.; Khwaja, R.; Azizur, T. *Biogenic fabrication of iron/iron oxide nanoparticles and their application*. *Nanoscale Research Letters*. 11. 10.1186/s11671-016-1714-0. DOI 10.1186/s11671-016-1714-0. 2016.
- Joly-duhamel, C ; Hellio, Dominique.; Ajdari A.; Djabouro, M. *All Gelatin Networks: The Master Curve for Elasticity*. Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, UMR ESPCI-CNRS 7636, and Laboratoire de Physico-Chimie Théorique, UMR ESPCI-CNRS 7083, 10, Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 5, France. DOI:10.1021/la020190m. 2002
- Kester, J. J.; Fennema, O. R. *Edible films and coatings: a review*. *Food Technology*, Chicago, v.40, n.12, p.47-59, 1986.
- Kim M.; Suh, H.; Cho, J.; Buratowski, S. *Phosphorylation of the yeast Rpb1 C-terminal domain at serines 2, 5, and 7*. *Journal Article | Research Support, N.I.H., Extramural*. doi: 10.1074/jbc.M109.028993. 2009
- Laboratório de química do estado sólido-UNICAMP. *Nanotecnologia : uma revolução em marcha*. LQES 2010. 27 Ago. 2014.
- Lajarim, C. N. Efeito da adição de gelatina nas propriedades termodinâmicas e nas características de géis e películas biodegradáveis obtidos a partir de amido de mandioca. Curso Superior de Engenharia de Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, 2014.
- Lopes, J. R. Síntese de nanopartículas de prata (npsag) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP. 2017.
- Lucena, C. A. A., Costa, S. C., Eleamen, G. R. A., Mendonça, E. A. M., Oliveira, E. E. Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. *Revista Polímeros*, 2015.
- Marcilla, A.; Gómez-Siurana, A.; Gomis, C.; Chápulo, E.; Catalá, M. C.; Valdés, F. J. *Characterization of microalgal species through TGTA/FTIR analysis: Application to *Nannochloropsis sp.** *Termochim. Acta*, v. 484, p. 41-47, 2009.
- Monteiro, R. T. R biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: Melo I. S. De; Silva, C. M. M. S.; Spessoto, a. *Biodegradação*. Jaguariuna, p. 1 14. 2001.
- Morones, j.; Elechiguerra, j.; Camacho, a.; Holt, k.; Kouri, j.; Ramirez, j. T.; Yacaman, m. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, Bristol, v. 16, p. 234-235. 2005.

- Oliveira, E. E.; Lucena, C. A. A.; Costa S. C., Desenvolvimento de biofilmes à base de xilana e xilana/gelatina para produção de embalagens biodegradáveis. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campina Grande, PB, Brasil 2007.
- Oliveira, R. A. Estudo sobre a conversão, formação e desenvolvimento de nanopartículas de prata pelo método de Turkevich modificado. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/D.3.2013. 2013
- Oriakhi, C. O. Polymer Nanocomposition Approach to Advanced Materials. *Journal of Chemical Education*, v.77, p.1138-1142, 2000.
- Orlowski, S.; Lawn, S.; Venning, A.; Winsall, M.; Jones, G.; Wyld, K.; Damarell, R.; Antezana, G.; Schrader, G.; Smith, D.; Collin, P.; Bidargaddi, N. *Participatory Research as One Piece of the Puzzle: A Systematic Review of Consumer Involvement in Design of Technology-Based Youth Mental Health and Well-Being Interventions*. *JMIR Human Factors*. 2. e12. 10.2196/humanfactors.4361. 2014.
- Pedrassani, D.; Kohl, T.; Helenita, G., Pontarolo. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de amostras de animais atendidos em hospital veterinário. *Revista interdisciplinar. Professora da Universidade do Contestado, Departamento de Medicina Veterinária, Canoinhas, Brasil. Saúde Meio Ambient. ISSN 2316-347X. v. 5, n. 2, p. 115-127, jul./dez. 2016 .*
- Pessanh, K. L. F. Farmanguinhos especialização em tecnologias industriais farmacêuticas polímeros biodegradáveis adicionados de nanopartículas como embalagem para alimentos. Monografia de PósGraduação Lato Sensu, para Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas. Fundação Oswaldo Cruz instituto de tecnologia em fármacos. Rio de janeiro. RJ 2016
- Piatti, T.; Rodrigues, R. Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS Maceió/AL, 2005.
- Piatti, T. M.; Rodrigues, R. A. F. Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. Série: Conversando sobre Ciências em Alagoas, p.15. EDUFAL, 2005.
- Queiros, P. F. Uso de embalagens plásticas na conservação, pós-colheita e qualidade de goiabas Trabalho de conclusão de curso apresentado à Banca Examinadora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária BRASÍLIA – DF, 2017.
- Rhim, J-W.; Park, H-M.; Ha, C-S. *Bio-nanocomposites for food packaging applications*. *Progress in Polymer Science*, v. 38, p. 1629– 1652. 2013.
- Sasaki, J. C. S; Macri, R. C. V. *Mechanical improvement in biodegradable bioplastic from natural compounds*. Simpósio de tecnologia ambiental e de biocombustíveis, trabalho científico. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 11, p. 256-260, 2019
- Schrooyen, P. M. M., Van Der Meer, R., De Kruif, C. G. *Microencapsulation: its application in nutrition*. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475–479, 2001.
- Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. *Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities*. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.
- Silva E.; M. Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão, Escola de Engenharia Química da Universidade do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2017.
- Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A.V.; Rutkowsky, S.A.; Boritz, C. *Synthesis and Study of Silver Nanoparticles*. *Journal of Chemical Education*, v. 84, n. 2, p. 322-325, 2007.
- Sousa, G. M. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 88 .2012.
- Souza, A. M.; Tadeu, G.; Biodegradação de polietileno e bioplástico no solo. *Revista Ambiente e Água*. Vol. 11, p1172-1180. 9p. 2016.
- Stoppa, M. A. Casemiro, L. A.; Vinholis, A. H. C.; Cunha W. R.; Silva, M. L. A.; Martins, C. H. Gomes.; Furtado N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009 .

- Tai, B.; Nhiem, N.; Van, K. P.; Van, M. C.; Ban N.; Cuong N. *Phenylpropanoid glycosides from Heterosmilax erythrantha and their antioxidant activity*. Archives of pharmacal research. p. 1373-7. 2008.
- Vaidyanathan, R., Gopalram, S., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., Gurunathan, S. *Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 75(1), p. 335-341, 2010.
- Vroman I, Tighzert L. *Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms*. Journal of Applied & Environmental Microbiology. 5(1):8-19. doi: 10.12691/jaem-5-1-2. 2017.
- Yilma, M.; Singh, A. P. *Production floor layout using systematic layout planning in Can manufacturing company*. In: IEEE International Conference on Control, Decision and Information Technologies. CoDIT, Hammamet, Tunisia: p. 822 – 828, 2013.
- Zhao, X.; Zhou, L.; Riaz, S.; Yan, L.; Jiang, C.; Shao, D.; Zhu, J.; Shi, J.; Huang, Q.; Yang, H.; Jin, M. *Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges*. Critical Reviews in Biotechnology. 38. 1-19. 10.1080/07388551.2017.1414141.2017.