



DOI: 00.0000/0000-0000.2018x0y0z0

## Avaliação microbiológica de ovos revestidos com nanobiopolímero a base de isolado proteico de soro

*Microbiological evaluation of coated eggs with nanobiopolymer based on whey protein isolate*

**SOARES, Rodrigo De Araújo.** Docente do curso de superior de Tecnologia em Alimentos do IF SERTÃO - Campus Salgueiro. BR 232 - km 508 s/n - Salgueiro - Pernambuco - Brasil. CEP: 56.000-000 / E-mail: [prof.rodrigo.araujo@gmail.com](mailto:prof.rodrigo.araujo@gmail.com)

**DA SILVA, Elisabeth Mary Cunha.** E-mail: [elisabeth.cunha@gmail.com](mailto:elisabeth.cunha@gmail.com)

**LADEIRA, Natália De Mani.** E-mail: [natyladeira@hotmail.com](mailto:natyladeira@hotmail.com)

**PICCOLI, Roberta Hilsdorf.** Universidade Federal de Lavras. E-mail: [rhpicoli@dca.ufla.br](mailto:rhpicoli@dca.ufla.br)

**DIAS, Marali Vilela.** Universidade Federal de Lavras. E-mail: [marali.dias@dca.ufla.br](mailto:marali.dias@dca.ufla.br)

**OLIVEIRA, Cristiane Ayala De.** Docente do curso de superior de Tecnologia em Alimentos do IF SERTÃO - Campus Salgueiro. BR 232 - km 508 s/n - Salgueiro - Pernambuco - Brasil. CEP: 56.000-000 / E-mail: [cristiane.ayala@ifsertao-pe.edu.br](mailto:cristiane.ayala@ifsertao-pe.edu.br)

**BORGES, Soraia Vilela.** Universidade Federal de Lavras. IF SERTÃO - Campus Salgueiro. E-mail: [sborges@dca.ufla.br](mailto:sborges@dca.ufla.br)

### RESUMO

Avaliação microbiológica de ovos revestidos com nanobiopolímero a base de isolado proteico de soro. O ovo é um alimento proteico barato e acessível, mas que está sujeito a contaminação microbiológica, acarretando perigo potencial aos consumidores, principalmente se *Salmonella* estiver presente. Fungos também representam sério problema para a qualidade de ovos, podendo levar à rejeição pelo consumidor. Visando solucionar este problema, desenvolveu-se um revestimento a base de isolado proteico de soro de leite (IPS) com nanopartículas de montmorilonita adicionado do agente antimicrobiano metabissulfito de sódio. A pesquisa objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do revestimento contra *Salmonella Enteritidis*, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli* quando aplicado em ovos brancos. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as populações de *S. Enteritidis* das cascas revestidas e sem revestimento. *A. sydowii* e *P. paxilli* apresentaram crescimento tanto nas cascas de ovos sem revestimento quanto nas cascas de ovos revestidos, evidenciando que o revestimento não foi capaz de inibi-los nas condições testadas. Concluiu-se que o revestimento desenvolvido não apresenta atividade antimicrobiana contra *S. Enteritidis*, *A. sydowii* e *P. paxilli* nas condições testadas.

Palavras-Chave: Revestimento, Biopolímero, Segurança alimentar.

### ABSTRACT

Microbiological evaluation of coated eggs with nanobiopolymer based on whey protein isolate

Egg is an inexpensive and affordable protein food, but it is subject to microbiological contamination, posing a potential danger to consumers, especially if *Salmonella* is present. Fungi also represent a serious problem for egg quality and can lead to consumer rejection. Aiming to solve this problem, a coating based on Whey Protein Isolate (WPI) was developed with montmorillonite nanoparticles added of sodium metabisulfite as antimicrobial agent. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial activity of the coating against *Salmonella enterica Enteritidis*, *Aspergillus sydowii* and *Penicillium paxilli* when applied on white eggs. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between



the *S. Enteritidis* populations of the coated and uncoated egg shells. *A. sydowii* and *P. paxilli* showed growth in both uncoated and coated eggshells, evidencing that the coating was not able to inhibit them under the conditions tested. It is concluded that the coating developed shows no antimicrobial activity against *Salmonella Enteritidis*, *Aspergillus sydowii* and *Penicillium paxilli* under the conditions tested.

keywords: Coating. Biopolymer. Food safety.

## Introdução

Ovos são alimentos perecíveis que estão sujeitos a contaminação por micro-organismos patogênicos e deterioradores. A estrutura porosa da casca permite que contaminantes como bactérias e odores possam adentrar o ovo (LELEU et al., 2011; CANER; YÜCEER, 2015), e a *Salmonella Enteritidis* é uma das primeiras bactérias encontradas em seu interior após a contaminação da casca (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2013). A contaminação de ovos por salmonela é uma questão complexa, afetada por variáveis em cada estágio do processo de produção de alimentos, não sendo possível garantir a produção de ovos livres desta bactéria (WHILEY; ROSS, 2015).

A presença de fungos também representa um grave problema para produção e comercialização de ovos, tendo sido encontrados os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* em ovos comercializados no Brasil (FRAGA; CURVELLO; ROSA, 2007).

Com o intuito de solucionar problemas como estes, pesquisas com biopolímeros adicionados de componentes antimicrobianos tem sido objeto de pesquisas, e as proteínas do soro de leite tem-se destacado na forma de filmes com potencial utilização em alimentos (FERNÁNDEZ-PAN; ROYO; MATÉ, 2012; RAMOS et al., 2012; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2009).

O isolado proteico de soro de leite (IPS) possui boa propriedade de barreira a gases e aparência brilhante, o que a torna atrativa para uso como embalagem e favorece sua aceitação pelo consumidor. Contudo, filmes produzidos exclusivamente de concentrado ou isolado proteico de soro de leite mostram-se quebradiços, sendo necessária a incorporação de um plastificante à matriz polimérica. O glicerol é um plastificante hidrofílico bastante empregado por aumentar a mobilidade molecular e, por consequência, a flexibilidade e hidrofiliidade dos filmes plastificados (MALI et al., 2004). Com a finalidade de melhorar as propriedades mecânica e de barreira do IPS, pode-se incorporar também à estrutura do biopolímero partículas em nanoescala (QAZANFARZADEH; KADIVAR, 2016), como os argilominerais.

A montmorilonita (MMT) é uma das nanoargilas mais utilizados na produção de nanocompósitos, e ao ser adicionada a um biopolímero, é capaz de promover a formação de uma via tortuosa através da qual os elementos permeáveis têm maior dificuldade em penetrar no nanocompósito (ECHEVERRÍA; EISENBERG; MAURI, 2014).

A aplicação de nanocompósitos pode melhorar as propriedades de flexibilidade, durabilidade, estabilidade e barreira a gases, além de possibilitar a incorporação de nanomateriais com propriedades nutricionais e/ou antimicrobianas, contribuindo para estender a vida útil dos mais diversos alimentos e reduzir os resíduos de embalagens CHAUDHRY; CASTLE, 2011). Dessa forma é possível desenvolver uma embalagem ativa que libere um composto antimicrobiano diretamente na



superfície do alimento, necessitando assim de quantidades bem menores que aquelas requeridas caso o antimicrobiano fosse incorporado diretamente ao alimento (SOARES et al., 2009).

Dentre os compostos antimicrobianos permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2008) estão o dióxido de enxofre e seus sais, que incluem os metabissulfito de sódio (MBS) e de potássio. Estes são aditivos multifuncionais, atuando na prevenção do escurecimento enzimático e não enzimático, no controle microbiológico, como antioxidante e agente branqueador (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de um revestimento a base de IPS adicionado de nanopartícula de MMT e incorporado de MBS aplicado em cascas de ovos, contra *Salmonella enterica* Enteritidis, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli*.

## Material e métodos

### Manutenção e padronização das culturas microbianas

A cepa bacteriana utilizada no experimento foi a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis S64, gentilmente cedida ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA/UFLA pela pesquisadora Dália dos Prazeres Rodrigues - Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções /Departamento de Bacteriologia /IOC/ Fiocruz.

A curva de crescimento da bactéria foi determinada através da inoculação de 1 mL da cultura bacteriana em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) previamente esterilizado, seguido de incubação a 37 °C, com monitoramento do crescimento, de hora em hora, por meio de espectrofotometria (600 nm) e plaqueamento em meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA). O procedimento foi repetido até chegar a leituras constantes, garantindo, assim, a fase estacionária. Por meio desse procedimento, foi possível padronizar a cultura reveladora em 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de caldo TSB. A manutenção da cepa era realizada a cada trinta dias por meio de repicagem da cultura e estocagem a -18 °C, em microtubos contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), NaCl (5 g), H<sub>2</sub>O (1.000 mL) e ajustado a pH 7,2 ± 0,2].

Os fungos *Aspergillus sydowii* (CCDCA 10249) e *Penicillium paxilli* (CCDCA 10255) utilizados no experimento foram fornecidos pela Coleção de Cultura de Micro-organismos do DCA/UFLA. Para a manutenção da viabilidade das cepas, um leve toque na cabeça conidial dos fungos foi feita com o auxílio de palitos de madeira estéreis (121 °C/ 20 minutos), sendo transferidos para placas de Petri contendo Malt Extract Agar estéril (MA - 20 g de extrato de malte, 20 g de ágar e 1 L de água destilada). As placas eram incubadas por 10 dias a 25 °C, seguida de armazenamento refrigerado (- 10 °C). A cada 30 dias, o processo era repetido a fim de manter as culturas viáveis.

A padronização dos inóculos foi feita a partir de placas crescidas com fungos, as quais foram cobertas com 10 mL de água destilada contendo duas gotas de tween 80. Com o auxílio de alça de Drigalski, os esporos foram suspensos na solução, que foi filtrada em gaze estéril e recolhida em bquer. Para a obtenção da concentração de esporos necessária, 1 mL do filtrado foi diluído em tubo



com 9 mL de água destilada estéril, seguida de homogeneização cautelosa. Uma alíquota de 10 µL desta suspensão de esporos foi colocada em câmara de Neubauer até seu completo preenchimento, sendo então levada para contagem em microscópio ótico com aumento de até 400 vezes. Diluições sucessivas foram feitas até alcançar a concentração padrão de 10<sup>7</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> de solução.

### **Escolha dos ovos para o experimento**

Os ovos brancos utilizados no experimento eram de classe A, tipo Extra, com peso médio de 62,84 g ± 1,41, provenientes da granja do Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Estes foram coletados no período da manhã, selecionados quanto a ausência de sujidades externas e de trincas, sendo levados imediatamente para o laboratório de embalagens do DCA/UFLA, onde foram analisados em ovoscópio, pesados e identificados. A gravidade específica dos ovos foi determinada em pools de 10 ovos, por repetição, obtendo-se o valor médio de 1,084 ± 0,0003 (FREITAS et al., 2004).

O ensaio envolveu um plantel com poedeiras comerciais da linhagem Hy Line W36 criadas em gaiolas e com 78 semanas de idade.

### **Revestimento a base de isolado proteico de soro de leite (IPS)**

Para a elaboração do revestimento foram utilizados isolado proteico de soro (WPI 9410), com mínimo de 91% de proteína, da Hilmar Ingredients (EUA); glicerol da Sigma-Aldrich (Brasil); nanopartículas de montmorilonita (Cloisite Na<sup>+</sup>) da Southern Clay Products (EUA) e ácido cítrico P.A da Proquímios (Brasil). O agente antimicrobiano testado foi o metabissulfito de sódio P.A da Synth (Brasil), na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup> de revestimento.

A formulação não pode ser detalhada por estar em processo de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o no BR 1020170176410.

### **Montagem do experimento e monitoramento dos micro-organismos**

Vinte ovos tiveram seu conteúdo drenado e pedaços de casca com aproximadamente 1 cm x 1 cm foram retirados da parte equatorial dos ovos. Em seguida, as cascas foram lavadas com água clorada (50 ppm) e sanificadas com álcool 70%, seguida de esterilização por radiação ultravioleta (UV) durante 30 minutos, em câmara de fluxo laminar, a fim de eliminar os micro-organismos presentes na casca. Amostras de cascas foram submetidas às análises de *Salmonella* e de fungos e leveduras (SILVA et al., 2010), a fim de verificar a eficácia do método empregado na esterilização. Para o experimento com *Salmonella*, 40 µL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) com ágar (0,40% p/v) estéril foi uniformemente espalhado por toda a superfície dos pedaços de casca, formando uma fina camada. Em seguida, cada um dos pedaços foi inoculado com 10 µL de caldo TSB contendo *S. Enteritidis* na concentração de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. As cascas foram então divididas em dois grupos: sem revestimento e com revestimento.



As cascas sem revestimento foram colocadas em placas de Petri estéreis semiabertas e acondicionadas em dessecador contendo solução saturada de NaCl. O dessecador foi armazenado em câmara climática à 25 °C durante todo o experimento. A solução salina teve a função de gerar umidade relativa de 75% dentro do dessecador. As cascas revestidas foram uniformemente cobertas com 100 µL do revestimento, e acondicionadas no dessecador. Esse procedimento visou simular a transmissão horizontal de *Salmonella*, na qual a contaminação ocorre depois que o ovo é posto. O experimento foi feito com três repetições, sendo utilizados três pedaços de casca para cada tempo de análise (0, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h).

No momento das análises, cada pedaço de casca foi colocado em tubo contendo 10 mL de água peptonada estéril, homogeneizado por 5 minutos em agitador Vortex, seguida de diluição seriada decimal e plaqueamento por superfície (Spread Plate) em meio de cultura Hektoen estéril (SILVA et al., 2010). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas seguida de contagem das colônias típicas. A média do número de UFC contadas nas placas em triplicata, multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e pelo fator de correção da alíquota ( $\times 10$ ) forneceram a quantidade de micro-organismos por  $\text{cm}^2$ .

A confirmação de *Salmonella* foi feita em colônias típicas que foram transferidas para os caldos tetracionato e rappaport (enriquecimento seletivo), incubadas à 25 °C e 37 °C por 24 horas, seguida de estriamento em ágar Rambach Merck® (plaqueamento diferencial) e incubação por 24 horas a 37 °C.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2014). Os dados foram utilizados para verificar a atividade antibacteriana in situ do revestimento frente à *S. enterica* Enteritidis S64 na casca dos ovos.

Para o experimento com fungos, o procedimento foi similar ao descrito acima, diferenciando-se apenas pelo substrato superficial (40 µL de solução nutritiva estéril contendo 2% p/v de extrato de malte, 0,5% p/v de glicose e 0,4% p/v de ágar) e inóculo (10 µL da suspensão aquosa contendo  $10^7$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ ). Esse procedimento visou simular a contaminação do ovo no ambiente de postura. O experimento foi feito com três repetições e de forma independente para cada uma das espécies de fungos (*Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli*). Foram analisados três pedaços de casca a cada 24 horas durante 5 dias (0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). O monitoramento do crescimento fúngico consistiu em verificar, visualmente, alterações na superfície das cascas, tais como coloração, aparecimento de hifas e micélios e formação de massa fúngica.

## Resultados e discussão

Avaliações microbiológicas das cascas dos ovos realizadas anteriormente à aplicação dos inóculos não detectaram a presença de *Salmonella* spp. e nem de fungos e leveduras, comprovando que a limpeza e sanitização das cascas foram eficazes.

### Análise de *Salmonella* na casca dos ovos



Conforme a análise estatística, não houve interação significativa ( $p > 0,05$ ) entre os fatores estudados (tempo de armazenamento x tipo de revestimento) sobre a população de *S. Enteritidis* nas cascas dos ovos (TABELA 1).

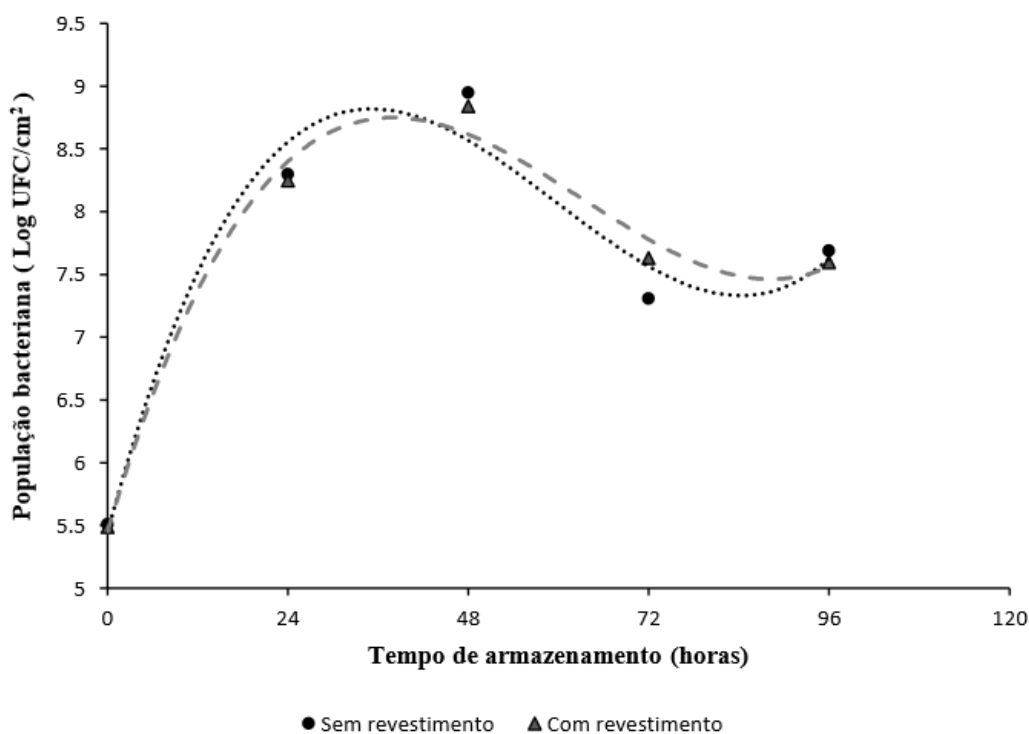
Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA) da população de *Salmonella* (log UFC/cm<sup>2</sup>) na casca de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento por 96 horas à temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 3\%$ .

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tipo de Revestimento	1	0,000682	0,000682	0,024	0,88 ns
Tempo armazenamento	4	39,24	9,81	339,57	0,000 *
Revestimento x Tempo	4	0,184	0,046	1,59	0,215 ns
Resíduo	20	0,578	0,0289	-	
Total	29	11.211,37			

ns - não significativo ao nível de 5% de significância; \* - significativo ao nível de 5% de significância.

O tempo de armazenamento afetou o crescimento bacteriano, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a população de *S. Enteritidis* nos ovos com e sem revestimento (FIGURA1).

Figura 1 - Contagem da população de *Salmonella* Enteritidis em cascas de ovos revestidos e sem revestimento durante armazenamento à temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $75 \pm 3\%$





Observou-se que nas primeiras 48 horas, a população aumentou em mais de 3 ciclos log UFC/cm<sup>2</sup>, para ambos os tratamentos, indicando que o antimicrobiano presente no revestimento não foi capaz de inibir a bactéria nas condições testadas. O fato da casca estar seca, devido a desidratação causada pelo álcool usado em sua sanitização, criou um meio com baixa umidade, impedindo a difusão do MBS e tornando-o indisponível para a ação bactericida. De acordo com Xu et al. (2013), a presença de umidade e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, propicia maior liberação do dióxido de enxofre em filmes contendo MBS.

No tempo de 72 horas, a população bacteriana dos ovos sem revestimento e revestidos reduziram em 1,64 e 1,21 ciclos log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Essa redução se deve, possivelmente, à escassez de nutrientes já que a população bacteriana havia aumentado muito nas primeiras 48h, mas a quantidade de nutrientes na casca não sofreu nenhum incremento.

Nos tempos 72 h e 96 h, a população bacteriana não diferiu significativamente, para ambos os tratamentos, indicando um novo ponto de equilíbrio populacional. As equações  $y = 0,00002x^3 - 0,0038x^2 + 0,2029x + 5,4527$  ( $R^2 = 0,9848$ ) e  $y = 0,00003x^3 - 0,0045x^2 + 0,2229x + 5,4463$  ( $R^2 = 0,9580$ ) descrevem a evolução populacional da bactéria durante o período de armazenamento para os ovos revestidos e sem revestimento, respectivamente.

Apesar de não ter apresentado atividade antibacteriana contra a *S. Enteritidis*, é possível que o revestimento possa criar uma barreira à entrada da bactéria para o interior do ovo, desde que aplicado logo após a limpeza da casca. Xie et al. (2002) avaliaram a penetração de um corante (Blue Lake) com partículas de 0,6 mm de diâmetro, que é do tamanho da maioria das bactérias, inclusive da *S. Enteritidis*, em ovos lavados e revestidos com diversos compostos (isolado proteico de soja, glúten de trigo, carboximetilcelulose e IPS). Os autores observaram que apenas o revestimento de IPS foi capaz de bloquear os poros dos ovos a ponto de impedir a penetração de 100% destas partículas, levando-os a supor que o uso deste revestimento na casca de ovos possa diminuir acentuadamente a contaminação horizontal pós-lavagem.

### Análise de fungos na casca dos ovos

O monitoramento visual das cascas dos ovos mostrou que o revestimento não foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli*, nas condições testadas (TABELA 2).

**Tabela 2 - Monitoramento da superfície das cascas de ovos sem revestimento e revestidas inoculadas com fungos.**

Tempo (horas)	Fungos	Aparência superficial	
		Cascas sem revestimento	Cascas revestidas
0	<i>A. sydowii</i>	Levemente amarelado*	Levemente amarelado*
	<i>P. paxilli</i>	Levemente amarelado*	Levemente amarelado*



24	<i>A. sydowii</i>	Levemente amarelado*	Levemente amarelado*
	<i>P. paxilli</i>	Levemente amarelado*	Levemente amarelado*
48	<i>A. sydowii</i>	Levemente amarelado*	Pequenos pontos esparsos e enegrecidos
	<i>P. paxilli</i>	Levemente amarelado*	Levemente amarelado*
72	<i>A. sydowii</i>	Pequenos pontos esparsos e enegrecidos	Aumento da quantidade de pontos enegrecidos
	<i>P. paxilli</i>	Levemente amarelado*	Levemente amarelado*
96	<i>A. sydowii</i>	Aumento da quantidade de pontos enegrecidos	Formação de massa fúngica concentrada e enegrecida
	<i>P. paxilli</i>	Aparecimento de tom esverdeado em pequenas partes da casca.	Aparecimento de tom esverdeado e pontos negros esparsos.
120	<i>A. sydowii</i>	Pontos enegrecidos sem aumento significativo em relação à observação anterior (96h).	Massa fúngica enegrecida densa e recoberta por leve camada de aspecto de algodão, e espalhada por toda a casca do ovo.
	<i>P. paxilli</i>	Sem grandes alterações em relação à observação anterior (96h).	Aumento da tonalidade esverdeada e poucos pontos negros nas bordas da casca.

Observa-se que o *A. sydowii* foi o fungo que mais se desenvolveu nos ovos revestidos, sendo possível verificar seu crescimento em apenas 48 horas de incubação. Nas horas seguintes, o crescimento foi intenso, com formação de uma massa enegrecida e densa na superfície da casca (96 horas); e aparecimento de micélios brancos e cotonosos no último dia de análise (120 horas), indicando que este fungo teve pleno acesso aos nutrientes necessários para seu crescimento. As cascas de ovos sem revestimento também apresentaram crescimento fúngico, porém menos acentuado, levando a supor que o revestimento, ao invés de inibir, propiciou o crescimento do *A. sydowii*.

Resultado similar foi observado para o fungo *P. paxilli*, entretanto com menor intensidade, pois o crescimento visível ocorreu apenas após 96 horas de incubação, para ambas as cascas, sendo maior nas cascas revestidas.

É possível que a concentração de MBS utilizada no revestimento ( $550 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) tenha sido insuficiente para inibir a grande quantidade de fungos ( $10^5$  esporos/cm<sup>2</sup>) presente nas cascas. Essa hipótese é sustentada pelas observações de Santos et al. (2013) que, estudando os efeitos do MBS sobre o crescimento *in vitro* de quatro espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, verificaram que apenas concentrações acima de 5% ( $50.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de MBS foram capazes de inibir todas as espécies; concentração 90 vezes maior que a presente no revestimento testado.

Em geral, os fungos filamentosos são mais resistentes que bactérias e leveduras, e por isso a dificuldade em encontrar um agente efetivo contra a maioria das cepas. Xavier et al. (2007) observaram a alta resistência de diferentes espécies de *Aspergillus* aos agentes químicos iodóforo,





cloreto de benzalcônio e digluconato de clorexidina. Bus et al. (1991) também verificaram a resistência de algumas estirpes de *Penicillium* à diferentes concentrações dos fungicidas benomil, tiabendazol e imazalil. Em comum estes trabalhos mostram que até mesmo compostos consagrados no controle fúngico estão sujeitos à variáveis como espécie de fungo, condições ambientais e concentrações utilizadas.

É possível também que o MBS não tenha conseguido se difundir pelo meio nutriente contendo os fungos, conforme ocorrido no teste com a *Salmonella*. O fato da casca estar extremamente seca provavelmente fez com que o meio nutriente tenha perdido muita umidade, impedindo a difusão e acesso do MBS aos fungos.

O maior crescimento de ambos os fungos nas cascas revestidas, em comparação com as cascas sem revestimento, se deve, provavelmente, ao alto teor de proteína deste revestimento, que pode ter sido utilizado no metabolismo destes micro-organismos. Fungos filamentosos como o *Aspergillus* e o *Penicillium* possuem capacidade de produzir proteases, também conhecidas como peptidases ou peptídeo hidrolases (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, 2007; ORLANDELLI et al., 2012), que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em moléculas de proteína. Dessa forma, peptídeos menores e aminoácidos livres são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento celular (RAO et al., 1998; ZANPHORLIN et al., 2011).

Normalmente os fungos produzem enzimas proteolíticas em fontes nitrogenadas proteicas mais complexas do que em fontes de nitrogênio inorgânico ou com baixo peso molecular (KUCERA, 1981), e isso parece ter ocorrido na casca revestida, já que o revestimento era feito à base de isolado proteico de soro. Essa composição, juntamente às condições de incubação (25 °C e 75% de umidade relativa) parecem ter sido fundamental para o maior desenvolvimento dos fungos nas cascas revestidas.

## Conclusões

O revestimento a base de isolado proteico de soro de leite com nanopartícula de montmorilonita e metabissulfito de sódio não apresenta atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis, *Aspergillus sydowii* e *Penicillium paxilli* nas condições testadas, quando aplicado em cascas de ovos brancos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e às Universidades Federais de Lavras (UFLA) e do Ceará (UFC) pela realização deste trabalho. O primeiro autor agradece também ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF Sertão PE), campus Salgueiro, pela concessão de seu afastamento integral para cursar doutorado.



## Referências

SOBRENOME, A. B.; SOBRENOME, C. D. **Nome da obra**. Petrolina: IF Sertão Pernambucano, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC no 64, de 16 de setembro de 2008**. Aprova o regulamento técnico sobre a atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. Poder Executivo, publicado no DOU no 180, de 17 de setembro de 2008.

BUS, V. G.; BONGERS, A. J.; RISSE, L. A. **Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins**. Plant Disease, v. 75, n. 11, p. 1098-1100, 1991.

CANER, C.; YÜCEER, M. **Efficacy of various protein-based coating on enhancing the shelf life of fresh eggs during storage**. Poultry Science, v. 94, n. 7, p. 1665-1677, 2015.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. **Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries**. Trends Food Science Technology, v. 22, n. 11, p. 595-603, 2011.

ECHEVERRÍA, I.; EISENBERG, P.; MAURI, A. N. **Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting**. Journal of Membrane Science, v. 449, p. 15-26, 2014.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; ROYO, M.; MATÉ, J. I. **Antimicrobial Activity of Whey Protein Isolate Edible Films with Essential Oils against Food Spoilers and Foodborne Pathogens**. Journal of Food Science, v. 77, n. 7, p. M382 - M390, 2012.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons**. Ciência e Agrotecnologia, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F. A.; ROSA, C. A. R. **Isolamento de fungos em ovos tipo comercial**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 29, p. 37-39, 2007.

FREITAS, E. R.; SAKOMURA, N. K.; GONZALEZ, M. M.; BARBOSA, N. A. A. **Comparação de métodos de determinação da gravidade específica de ovos de poedeiras comerciais**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 5, p. 509-512, 2004.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGAMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN, L. A. **Purification**



**and characterization of thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. **Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH- 02 in solid-state fermentation**. *Pakistan Journal of Botany*, v. 39, n. 7, p. 2717-2724, 2007.

KUCERA, M. **The Production of Toxic Protease by Entomopathogeneous Fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture**. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 38, p. 33 - 38, 1981.

LELEU, S.; HERMAN, L.; HEYNDRIKX, M.; REU, K.D.; MICHIELS, C. W.; BAERDEMAEKER, J.D.; MESSENS, W. **Effects on Salmonella shell contamination and trans-shell penetration of coating hens eggs with chitosan**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, n.1, p. 43-48, 2011.

MACHADO, R. M.; TOLEDO, M. C.; VICENTE, E. **Sulfitos em Alimentos**. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. **Effects of yam starch on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*)**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 24, p. 7005-7011, 2003.

OLIVEIRA, B. L.; OLIVEIRA, D. D. **Qualidade e Tecnologia de Ovos**. 1. ed. Lavras: Editora UFLA, 2013, 224 p.

OLIVEIRA, T. M.; SOARES, N. F.; PAULA, C. D.; VIANA, G. A. **Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs**. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.

ORLANDELLI, R.; SPECIAN, V.; FELBER, A.; PAMPHILE, J. **Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações**. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 3, 2012.

QAZANFARZADEH, Z., KADIVAR M. **Properties of whey protein isolate nanocomposite films reinforced with nanocellulose isolated from oat husk**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p. 1134-1140, 2016.

RAMOS, O. L.; SILVA, S. I.; SOARES, J. C.; FERNANDES, J. C.; POÇAS, M. F.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. **Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds**. *Food Research International*, v. 45, n. 1, p. 351-361, 2012.

RAO, M. B. TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.



SANTOS, Y. F. M.; VELOSO, A. P. B.; CALVET, R. M.; PEREIRA, M. M. G.; PEREYRA, C. M.; DALCERO, A. M.; TORRES, A. M.; MURATORI, M. C. S. **Inhibitory effect of sodium metabisulphite and chlorine on growth of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. stains isolated from marine shrimp.** *Ciência Rural*, 43, p. 1721-1726, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** 4. ed. São Paulo: Varela, 2010, 624 p.

SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; PIRES, A. C. S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. **Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos.** *Revista Ceres*, 56, 4, p. 370-378, 2009.

XAVIER, M.O.; MADRID, I. M.; MEINERZ, A. R. M.; CLEFF, M. B.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. **Atividade *in vitro* de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 74, n.1, p.49-53, 2007.

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N. S.; JU, Z. Y.; MEULLENET, J.; WANG, H.; SLAVIK, M. F.; JANES, M. E. **Edible film coating to minimize eggshell breakage and reduce post-wash bacterial contamination measured by dye penetration in eggs.** *Journal of Food Science*, v. 67, n. 1, p. 280-284, 2002.

XU, W.; LI, D.; FU, Y.; WEI, H. **Preparation and Measurement of Controlled-Release SO<sub>2</sub> fungicide active packaging at room temperature.** *Packaging Technology and Science*, v. 26, p. 51-58, 2013.

WHILEY, H.; ROSS, K. **Salmonella and Eggs: From Production to Plate.** *International Journal of Environmental Research Public Health*, v. 12, n. 3, p. 2.543-2.556, 2015.

ZANPHORLIN, L. M. CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. **Purification and characterization of new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp.** *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p.2137-2143, 2011.