



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

GLEICE VASCONCELOS DA SILVA PEREIRA

Efeito da adição de ácidos graxos e surfactante sobre as propriedades funcionais de filmes biodegradáveis elaborados com proteínas miofibrilares de pescada amarela (*Cynoscionacoupa*)

BELÉM - PA
MARÇO, 2016

GLEICE VASCONCELOS DA SILVA PEREIRA

Efeito da adição de ácidos graxos e surfactante sobre as propriedades funcionais de filmes biodegradáveis elaborados com proteínas miofibrilares de pescada amarela (*Cynoscionacoupa*)

Dissertação de Mestrado VI apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia de Fátima Henriques Lourenço

BELÉM – PA
MARÇO, 2016

GLEICE VASCONCELOS DA SILVA PEREIRA

Efeito da adição de ácidos graxos e surfactante sobre as propriedades funcionais de filmes biodegradáveis elaborados com proteínas miofibrilares de pescada amarela (*Cynoscionacoupa*)

Dissertação de Mestrado VI apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia de Fátima Henriques Lourenço

Data de Avaliação: ____/____/____

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Lucia de Fátima Henriques Lourenço
(PPGCTA/UFPA – Orientadora)

Prof. Dr. Antônio Manoel da Cruz Rodrigues
(PPGCTA/UFPA – Membro Interno)

Prof. Dr. Eder Augusto Furtado Araújo
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele
(PPGCTA/UFPA – Membro Suplente)

RESUMO

Os biofilmes são películas flexíveis formadas a partir de macromoléculas biológicas, como as proteínas, os polissacarídeos e lipídeos capazes de formar uma matriz coesa e contínua além de fornecer resistência mecânica para a estrutura. Filmes biopoliméricos elaborados à base de proteínas possuem boas propriedades mecânicas e de barreira a gases. No entanto, filmes elaborados a partir desses materiais apresentam alta permeabilidade ao vapor de água e a incorporação de substâncias hidrofóbicas na sua composição surge como alternativa para diminuir esta propriedade de barreira, porém a incorporação dessas substâncias não ocorre de maneira homogênea, necessitando da adição de surfactante. O objetivo da pesquisa foi elaborar filmes biodegradáveis com proteínas miofibrilares de peixe, ácidos graxos (esteárico (AE), palmítico (AP) e capróico (AC) e surfactante (SDS) com a finalidade de produzir filmes com melhores propriedades funcionais. Para isso, foi adicionado o surfactante, que contém moléculas anfifílicas permitindo a substância interagir nas proteínas e nos ácidos graxos, tornando a matriz filmogênica menos heterogênea. Análises de propriedade de barreira ao vapor de água e propriedades mecânicas, solubilidade em água, cor, transparência e microscopia foram feitas para caracterizar os filmes. Observou-se que as adições dos ácidos graxos melhoraram a barreira ao vapor de água dos filmes, com 10% de SDS adicionados nestas formulações também melhoraram essa propriedade de barreira em relação ao filme elaborado somente com proteínas miofibrilares liofilizada (PML). A adição dos ácidos graxos e SDS proporcionaram filmes mais flexíveis, apresentando melhores valores de %E comparado ao filme PML. Filmes mais resistentes comparados ao filme PML foram produzidos quando utilizou-se 5% de ácido esteárico com 10% de SDS e 10% AP com 20% de SDS. A solubilidade em água dos filmes diminuiu com a utilização do SDS nas menores concentrações. Ao aumentar a concentração dos ácidos graxos e SDS obtiveram-se filmes menos transparentes, e com 10% de ácidos graxos e 20% de SDS os filmes apresentaram melhores propriedades de barreira na faixa do visível. Alta luminosidade dos filmes foi observada com adição somente dos ácidos graxos. Menor coloração amarelada comparado ao filme PML foi com a adição dos ácidos e SDS. Na análise das características morfológicas, através da microscopia eletrônica de varredura, foram observadas modificações na estrutura morfológica dos filmes pela adição dos ácidos graxos e do SDS. Concluiu-se que o surfactante melhorou a incorporação dos ácidos graxos tornando filmes mais homogêneos, porém proporcionando filmes esbranquiçados quando utilizado na maior concentração.

Palavras-chaves: Filme composto, proteína miofibrilar, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido capróico, surfactante SDS (Lauril sulfato de sódio).

ABSTRACT

Biofilms are flexible films formed from biological macromolecules, such as proteins, polysaccharides and lipids capable of forming a cohesive and continuous matrix and provide mechanical strength to the structure. Protein based biopolymers produced films have good mechanical and gas barrier properties. However, films made from those materials have high permeability to water vapor and the incorporation of hydrophobic substances in its composition is an alternative to reduce this barrier property, but the incorporation of these substances does not occur evenly, requiring the addition of surfactant. The objective of the research was developed biodegradable films with myofibrillar protein fish, fatty acids (stearic (AE), palmitic acid (PA) and caproic (AC)) and surfactant (SDS) in order to produce films with improved functional properties. To this, was added the surfactant, which contains amphiphilic molecules allowing the substance in the interacting protein and the fatty acid, a less heterogeneous filmogenic matrix. Analysis barrier property to water vapor and mechanical properties, water solubility, color, transparency and microscopy were performed to characterize the filmsthe barrier film to the water vapor with 10% SDS added in these formulations that have improved barrier property compared to the film prepared only with lyophilized myofibrillar protein (LMP). The addition of fatty acids and SDS provided more flexible films, with better values of% and compared to the film PML. Films more resistant compared to PML film were produced when we used 5% stearic acid 10% SDS and 10% AP of 20% SDS.The water solubility of the films decreased with the use of SDS in lower concentrations. By increasing the concentration of fatty acids and SDS were obtained less transparent films, and 10% fatty acids and 20% SDS films showed improved barrier properties in the visible range. High brightness of the films was observed only with the addition of fatty acids. Less yellowing compared to PML film was with the addition of acid and SDS.In the analysis of morphology by scanning electron microscopy, changes were observed in the morphological structure of the films by the addition of fatty acids and SDS. It was concluded that the surfactant improved incorporation of fatty acids becoming more homogeneous films, but providing whitened films when used in higher concentrations.

Keywords: Composite Film, myofibrillar protein, stearic acid, palmitic acid, caproic acid, SDS surfactant (sodium lauryl sulfate).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química dos ácidos esteárico, palmítico e capróico-----	23
Figura 2. Representação esquemática de um surfactante-----	25
Figura 3. Representação gráfica de uma micela de surfactante resultando uma gota de óleo-----	25
Figura 4. Estrutura do SDS-----	26
Figura 5. Ilustração do processo de micelização do SDS em solução aquosa. Na CMC os monômeros livres encontram-se em equilíbrio com o SDS micelizado-----	26
Figura 6. Fluxograma de obtenção das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML)-----	29
Figura 7. Fluxograma de elaboração dos filmes biodegradáveis-----	32
Figura 8. Concentrações utilizadas na elaboração dos filmes à base de proteína miofibrilar liofilizada (PML), ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante (laurel sulfato de sódio – SDS)-----	33
Figura 9. Microfotografia da proteína miofibrilar liofilizada de pescada amarela-----	39
Figura 10. Fotografias mostrando a transparência dos filmes: A) filme somente com proteína miofibrilar liofilizada (PML); filmes com PML, SDS e ácidos graxos: B) esteárico; C) palmítico e C) capróico.-----	46
Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura do filme apenas com proteína miofibrilar liofilizada (PML)-----	59
Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo proteína miofibrilar liofilizada (PML): PML e 5% de ácidos graxos; PML e 10% de ácidos graxos-----	61
Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo Proteína Miofibrilar Liofilizada (PML) e Lauril Sulfato de Sódio (SDS): PML, 5% ácidos graxos e 5% SDS;PML, 5% ácidos graxos e 10% SDS-----	63
Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo Proteína Miofibrilar Liofilizada (PML) e Lauril Sulfato de Sódio (SDS): PML,10% ácidos graxos e 20% SDS; PML, 10% ácidos graxos e 20% SDS	64

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Rendimento do Músculo de Peixe MP(%)-----	30
Equação 2. Rendimento da proteína miofibrilar liofilizada PML(%)-----	30
Equação 3. Cor dos filmes-----	34
Equação 4. Valor de transparência dos filmes-----	34
Equação 5. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes (PVA)-----	35
Equação 6. Solubilidade dos filmes (SOL%)-----	35
Equação 7. Resistência a tração dos filmes (RT)-----	36
Equação 8. Elongação dos filmes (%E)-----	36

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Percentual das composições utilizadas na elaboração dos filmes biodegradáveis-----	32
Tabela 2. Composição centesimal do músculo de peixe e da proteína miofibrilar liofilizada(PML)-----	37
Tabela 3. Cor dos filmes de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante SDS-----	42
Tabela 4. A transmissão de luz e a transparência dos filmes de proteína, ácido esteárico, palmítico e capróico e surfactante SDS-----	45
Tabela 5. Caracterização da permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes-----	49
Tabela 6. Solubilidade dos filmes composto de proteína, glicerol, ácido esteárico, palmítico e capróico e surfactante (SDS)-----	52
Tabela 7. Resistência a tração (RT) e percentual de alongação (%E) dos filmes composto de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante SDS-----	56

ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 SUBPRODUTOS GERADOS NA INDÚSTRIA PESQUEIRA	14
3.2 PROTEÍNA DE PEIXE	14
3.3 OBTENÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS	16
3.4 FILMES BIODEGRADÁVEIS	18
3.4.1 Filmes emulsionados	19
3.5 COMPOSTOS HIDROFÓBICOS NA ELABORAÇÃO DE FILME BIODEGRADÁVEIS	21
3.5.1 Ácidos graxos	22
3.6 SURFACTANTES	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAL	28
4.2 MÉTODOS	28
4.2.1 Obtenção do subproduto de pescada amarela	28
4.2.2 Obtenção das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML)	28
4.2.3 Determinação do rendimento do músculo de peixe (MP) e da extração da Proteína Miofibrilar Liofilizadas (PML)	29
4.2.4 Caracterização das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML)	30
4.2.4.1 Composição Centesimal das PML	30
4.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das PML (MEV)	30
4.2.5 Ensaio preliminares para elaboração dos filmes	30
4.2.6 Elaboração dos filmes biodegradáveis	31
4.2.7 Caracterização dos filmes biodegradáveis	33
4.2.7.1 Aspecto Visual	33
4.2.7.2 Espessura	33
4.2.7.3 Cor	34
4.2.7.4 Transmissão da luz e valor de transparência	34

4.2.7.5 Propriedade de barreira-----	34
4.2.7.6 Solubilidade em água-----	35
4.2.7.7 Propriedades mecânicas-----	35
4.2.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)-----	36
4.2.8 Análise Estatística-----	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	37
5.1 RENDIMENTO DO MÚSCULO DE PEIXE (MP) E DA PROTEÍNA MIOFIBRILAR LIOFILIZADA (PML)-----	37
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML)-----	37
5.2.1 Composição Centesimal do músculo de peixe e das PML-----	37
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das PML (MEV)-----	38
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS-----	39
5.3.1 Ensaios preliminares para elaboração dos filmes-----	39
5.3.2 Aspecto visual-----	40
5.3.3 Cor-----	40
5.3.4 A transmissão da luz e valor de transparência-----	43
5.3.5 Espessura-----	46
5.3.6 Propriedade de barreira-----	47
5.3.7 Solubilidade em água-----	51
5.3.8 Propriedades mecânicas-----	54
5.3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura dos filmes (MEV)-----	58
6 CONCLUSÃO-----	65
7 REFERÊNCIAS-----	66

INTRODUÇÃO

Os resíduos e os subprodutos do processamento da indústria de pesca podem alcançar até 70% do peso inicial dos peixes, e são considerados como matérias-primas de alta qualidade e baixo valor comercial, que não são utilizados na maioria dos casos, tornando-se dejetos que causam prejuízos ecológicos, sanitários e econômicos. Por outro lado, a indústria de alimentos busca constantemente novas estratégias para aumentar a vida comercial dos alimentos. Os filmes e revestimentos edíveis têm sido considerados uma das tecnologias com potencial para alcançar tais objetivos, a segurança microbiológica e a proteção dos alimentos da influência de fatores externos (PINHEIRO *et al.* 2010; PIRES *et al.* 2011).

A utilização dos subprodutos e a elaboração de biofilme semipermeável, biodigestível, biocompatível, biodegradável, com características protetoras e/ou ação fungicida e bactericida pode ser utilizado como uma alternativa rentável e promissora em sistemas de conservação, de grande importância na indústria de alimentos (DAMIAN *et al.* 2005), além de contribuir para diminuir os impactos ambientais por utilizar os subprodutos da indústria da pesca.

Desta forma, as pesquisas sobre embalagens têm sido direcionadas para a elaboração de filmes e revestimentos comestíveis à base de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos, que são totalmente biodegradados, em um período curto de tempo, contribuindo sobremaneira para diminuição da poluição ambiental (PINHEIRO *et al.*, 2010). Os biopolímeros naturais como os polissacarídeos e as proteínas, se apresentam mais promissores, em razão de serem abundantes, renováveis, econômicos, e capazes de formar uma matriz contínua (MALI *et al.* 2006).

Dentre as proteínas utilizadas como agente formador de filmes biodegradáveis, destacam-se as de origem animal, como gelatina, proteínas miofibrilares de peixes (IWATA *et al.*, 2000; MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000; RAGHAVAN e KRISTINSSON, 2008; LIMPAN *et al.*, 2010; ZAVAREZE *et al.* 2012), proteínas miofibrilares de carne bovina (SOUZA *et al.* 2004). As proteínas de pescado apresentam algumas propriedades vantajosas na elaboração de filmes, como habilidade formar redes, plasticidade e elasticidade e uma boa barreira ao oxigênio. Apresenta baixa barreira ao vapor

de água que pode ser modificada pela adição de plastificantes e/ou aditivos (ZAVAREZE *et al.* 2012).

As formulações à base de proteínas geralmente produzem películas com boa resistência mecânica, no entanto elas são higroscópicas. A inclusão de compostos hidrofóbicos melhora a barreira de vapor de água a mesma e as características mecânicas necessárias a um bom filme, indicando que a combinação de lipídios e proteínas pode gerar sinergia no que diz respeito à funcionalidade dos filmes resultantes desta combinação (CAROLINE *et al.* 2010).

No desenvolvimento de filmes e revestimentos o uso de materiais provenientes de fontes renováveis, tais como hidrocolóides de origem biológica, e a incorporação de ingredientes funcionais podem ser usados, por exemplo, como agentes antioxidantes e antimicrobianos. A funcionalidade e o comportamento dos filmes dependem principalmente das suas propriedades mecânicas e de transporte, que por sua vez dependem da composição do filme, do seu processo de formação e do método de aplicação no produto. Filmes à base de proteínas podem formar ligações em posições diferentes e oferecem grande potencial para estabelecer numerosas ligações (OU *et al.* 2005).

No entanto, quando os materiais com diferente hidrofobicidade são misturados, a adição de um emulsionante (surfactante) é necessária para permitir uma dispersão homogênea do material hidrofóbico na matriz de proteína hidrófila (CAROLINE *et al.* 2010). Os emulsionantes são amplamente utilizados na indústria de alimentos, alguns dos quais foram usados para desenvolver macromolécula com base em filmes, incluindo os Tweens (BRAVIN *et al.* 2004 e RODRIGUEZ *et al.* 2006) e Lauril Sulfato de Sódio SDS (DAVANÇO *et al.* 2007) .

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar filmes biodegradáveis com proteínas miofibrilares de peixe, ácidos graxos como o esteárico, palmítico e capróico e surfactante com a finalidade de produzir filmes com melhores propriedades funcionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair as proteínas miofibrilares de subproduto de pescado;
- Elaborar os filmes biodegradáveis com o isolado protéico;
- Verificar a influência do tamanho da cadeia dos ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) nas propriedades funcionais dos filmes;
- Verificar a influência da adição do surfactante Lauril Sulfato de Sódio (SDS) nas propriedades funcionais dos filmes;
- Caracterizar os filmes quanto sua funcionalidade: propriedade de barreira (permeabilidade ao vapor de água), propriedades mecânicas (resistência a tração - RT e percentual de alongação - %E), solubilidade em água e característica morfológica (microscopia eletrônica de varredura - MEV).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SUBPRODUTOS GERADOS NA INDÚSTRIA PESQUEIRA

Na medida em que gera uma grande quantidade de subproduto (ricos em proteína e lipídeos), onde são perdidos e deste modo não são recuperados para o uso humano, o processamento industrial de pescado também fornece muito mais do que alimentos nutritivos, como por exemplo, matéria-prima para elaborar filmes biodegradáveis, porém o uso de tecnologias convencionais para processar o pescado e criar valor acrescentado aos produtos deste, geralmente leva a uma utilização limitada do animal (KRISTINSSON e RASCO, 2002). Os subprodutos sólidos do beneficiamento do pescado são destinados principalmente à alimentação animal, mas também podem ser aproveitados para a produção de alimentos para consumo humano. O valor nutricional desses subprodutos, ricos em proteínas e em ácidos graxos da série ômega-3, incentiva o desenvolvimento de produtos para a alimentação humana (MIRANDA *et al.* 2003).

O alto teor protéico encontrado em peixes faz com que o principal destino dos subprodutos do beneficiamento seja para a produção de farinha de peixe, para alimentação animal (ARRUDA *et al.* 2006). O aproveitamento sustentável dos subprodutos de peixe foi discutido por Feltes (2010), visando desta forma um novo direcionamento, como a obtenção de produtos de valor agregado, por exemplo, filmes biodegradáveis e a redução destes gerados na indústria de pescado.

3.2 PROTEÍNA DE PEIXE

Os peixes são fonte de proteína rica em aminoácidos essenciais (lisina, metionina, cistina, treonina e triptofano). As proteínas do músculo de peixe são constituídas por vários grupos de proteínas: as proteínas sarcoplasmáticas que desempenham funções bioquímicas nas células; as proteínas miofibrilares que fazem parte do sistema contrátil; e as proteínas do tecido conjuntivo (estroma), principal responsável pela integridade dos músculos (ZAVAREZE *et al.* 2012).

As propriedades funcionais típicas das proteínas de sistemas alimentares são as seguintes: solubilidade, capacidade de retenção de água, viscosidade, capacidade de gelificação, propriedades emulsionantes, capacidade de formação de espuma, retenção de aromas, absorção de gordura, coesão-adesão e a elasticidade (DAMODARAN, 1997). As proteínas de fontes vegetais e animais também são importantes biopolímeros que podem ser utilizadas como agentes de formação de película (BENJAKUL *et al.* 2008).

As proteínas de pescado têm sido utilizadas para elaboração de filmes biodegradáveis, no entanto, apresenta barreira ao vapor de água baixa em razão da sua natureza hidrofílica, sendo que esta característica pode ser modificada pela adição de plastificantes hidrofóbicos e/ou aditivos (ZAVAREZE, 2012). Esta propriedade pode ser melhorada aplicando-se tecnologia, incluindo materiais, como os ácidos graxos e surfactantes, assim, estes compostos dispersos na matriz polimérica, podem melhorar as propriedades de barreira à umidade, atuando diretamente também nas propriedades mecânicas. Proteínas de diferentes fontes foram utilizadas para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis devido a sua abundância relativa e uma boa capacidade de formação de película (PRODPRAN *et al.* 2007).

De acordo com Danganan *et al.* (2009), existem três tipos de proteínas de pescado: sarcoplasmática, estroma e miofibrilar. As enzimas, a mioglobina e as proteínas citoplasmáticas são exemplos de proteínas sarcoplasmáticas. Proteínas do estroma incluem colágeno e elastina, enquanto proteínas miofibrilares incluem miosina, actina, tropomiosina e troponina. Proteínas do estroma e miofibrilar são usadas para fazer filmes comestíveis e revestimentos. Actina e miosina formam as principais frações das proteínas miofibrilares. A miosina é responsável por uma série de propriedades, como a gelificação, a retenção de água e a emulsificação (RAGHAVAN e KRISTINSSON, 2008).

As proteínas miofibrilares (PM) têm uma função importante no processamento dos produtos, pois influenciam a retenção de água, o rendimento, a textura e a coesão do produto final, em função do tipo do gel formado (FOEGEDING *et al.* 2006). Proteínas miofibrilares, contribuem para 55-65% da proteína total do músculo, ou 12% do peso do músculo esquelético, são excelentes agentes gelificantes e são em grande parte responsáveis pelas

características texturais e estruturais de produtos à base de carne (ACTON *et al.* 1982).

As proteínas miofibrilares são normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH da solução (ZAVAREZE *et al.* 2012). São proteínas solúveis em soluções salinas e podem ser extraídas com solução de cloreto de potássio (KCl) ou sódio (NaCl) a uma concentração igual ou superior a 0,5 M. Quando a miofibrila é dissolvida pela solução salina, forma-se uma solução pastosa de actomiosina, condição para que possa haver formação de elasticidade. Assim, neste caso, a função do sal é a de agente peptizante da miofibrila.

O aumento da concentração das proteínas miofibrilares que desempenham um papel essencial na formação de filmes biodegradáveis ocorre no processo de lavagem, que pode remover as proteínas de baixo peso molecular tal como as proteínas sarcoplasmáticas (HAMAGUCHI *et al.* 2007) que são solúveis em água ou em solução de baixa força iônica (HEMUNG e CHIN 2013). Se não for executada de forma eficiente o processo de lavagem a proteína sarcoplasmática poderia ser inserida entre as cadeias de proteínas miofibrilares durante a formação do filme, levando à diminuição da interação entre as miofibrilas. A formação do filme ocorre geralmente através do desenvolvimento de uma rede tridimensional de moléculas de proteínas por ligação iônica, ponte de hidrogênio, ligação hidrofóbica, e pontes dissulfeto (HAMAGUCHI *et al.* 2007).

As proteínas de pescado, incluindo as proteínas miofibrilares de músculos de peixe e sarcoplasmáticas, têm sido utilizadas como material formador de filmes biodegradáveis por vários pesquisadores (IWATA *et al.* 2000; PASCHOALICK *et al.* 2003; SHIKU *et al.* 2004; ARTHARN *et al.* 2007; PRODPRAN *et al.* 2007; CHINABHARK *et al.* 2007). Trabalhos realizados com proteínas miofibrilares de pescado, demonstram que possuem a capacidade de formar filmes transparentes e resistentes (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000; CORTEZ-VEJA *et al.* 2013).

3.3 OBTENÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

A utilização de películas comestíveis e revestimentos biodegradáveis têm sido constantemente crescentes na indústria alimentar (PRODPRAN *et al.*

2007). Filmes biodegradáveis de proteínas isoladas de peixe (PIP) apresentam barreira ao vapor de água baixa, devido à hidrofiliabilidade de aminoácidos em moléculas de proteínas e às quantidades significativas de plastificantes hidrófilos adicionados, tais como glicerol e sorbitol, necessários para conferir a flexibilidade do filme adequada (PRODPRAN *et al.* 2007). Para preparar uma película com PIP suficientemente flexível, a adição de quantidade elevada (40-60%) de plastificante, especialmente glicerol, é geralmente necessário (CHINABHARK *et al.* 2007; PRODPRAN *et al.* 2007).

Proteína isolada de peixe (PIP), elaborada por lavagem seguida de solubilização alcalina foi mostrado como o material de partida promissor com teores de proteína e lipídios para obtenção de filmes com as melhores propriedades mecânicas e físicas (TONGNUANCHAN *et al.* 2011). No entanto, o filme baseado PIP é rígido, devido à presença de forte ligação covalente, especialmente a de dissulfeto (ROCHA *et al.* 2013).

A proteínas miofibrilares de peixes devem ser extraídas antes da elaboração dos biofilmes, com a utilização de soluções salinas no músculo, ocasionando a dissolução das proteínas que devem ser centrifugadas para a separação das frações solubilizadas (HUF-LONERGAN *et al.* 1994).

Para preparar os filmes de proteínas miofibrilares, o pH da solução formadora de filme (FFS) necessita ser ajustado para mais alto ou mais baixo, (valores de pH extremos), do ponto isoelétrico (p_i) da proteína para completar a solubilização e não ocorrer a precipitação das mesmas (IWATA *et al.* 2000). Estas proteínas são totalmente estiradas e intimamente associadas umas às outras em estruturas paralelas e capazes de formar uma matriz contínua durante a secagem da solução (SHIKU *et al.* 2003).

Um dos processos mais amplamente utilizados na elaboração de biofilmes é o método de casting, que compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula e aditivos, aplicação dessa solução em um suporte adequado, seguida de secagem em condições estritamente controladas. Dessa forma, para a elaboração de biofilmes a partir de novas matérias-primas biológicas, é necessário, inicialmente, a obtenção do biopolímero e o conhecimento de suas propriedades, principalmente da sua solubilidade em água e sua capacidade de interação intermolecular (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000).

A preparação de biofilmes envolve agentes de formação de película, solventes e plastificantes, entre outros reagentes. Além disso, alguns compostos podem ser adicionados durante a produção de biofilmes para fornecer, por exemplo, melhores propriedades de barreira à água e mecânica. O uso de películas de polímeros naturais no setor da embalagem de alimentos tem sido estudado, devido à biodegradabilidade destes filmes e a sua capacidade para retardar o transporte de umidade, de gás, sabor e lipídios (MACIEL *et al.* 2012).

Filmes de proteínas miofibrilares têm relativamente melhores propriedades mecânicas quando comparados com filmes sintéticos (LIMPAN, *et al.* 2010). Várias tentativas têm sido realizadas na obtenção de filmes biodegradáveis para melhorar as propriedades destes, tais como, adição de outros componentes como ácidos graxos e surfactantes (OLIVEIRA *et al.* 2012 e DAVANÇO *et al.* 2007).

3.4 FILMES BIODEGRADÁVEIS

O impacto ambiental a partir de resíduos de materiais plásticos não biodegradáveis constitui crescente preocupação global. Com a intenção de substituir parcialmente esse tipo de material, vêm sendo realizadas pesquisas em busca de encontrar materiais poliméricos renováveis e ecológicos (KHWALDIA *et al.* 2010). Assim, surgiu o interesse em desenvolver filmes com características de embalagens biodegradáveis, que não causem danos ao meio ambiente (DAVANÇO *et al.* 2007).

Tecnologias baseadas em materiais renováveis e biodegradáveis são necessárias em todos os setores produtivos. (CARVALHO *et al.* 2008; KRISTO e BILIADERIS 2006 e THOMAZINE *et al.* 2005). Materiais poliméricos naturais, tais como polissacarídeos e proteínas, são biodegradáveis e podem, portanto, desempenhar um papel significativo para resolver os problemas ambientais provocados pelo uso de materiais poliméricos sintéticos (CORTEZ-VEJA, 2013). Esses materiais são utilizados para obtenção de filmes biodegradáveis e atuam como barreira a elementos externos, pois podem proteger os produtos embalados de danos físicos e biológicos, assim como

impedem a volatilização de compostos e a perda de umidade, aumentando a vida útil do produto (RHIM e NG, 2007).

A funcionalidade e o desempenho dos biofilmes e revestimentos dependem de suas propriedades mecânicas e de barreiras, que por sua vez dependem da composição do filme, do processo de formação e o método de aplicação no produto (AHMAD *et al.* 2012). Os materiais mais utilizados para a elaboração de biofilmes são misturas de lipídeos, proteínas, carboidratos, plastificantes, surfactantes, aditivos e solventes (AHMAD *et al.* 2012; ANDREUCCETTI *et al.* 2011), sendo necessário, pelo menos, um biopolímero que tenha a capacidade de formar uma matriz contínua, homogênea e coesa (FAKHOURI *et al.* 2009).

Em geral, há três tipos de película que podem ser elaboradas a partir destes materiais, composta, camada dupla ou simples. O primeiro tipo (que será estudado no presente trabalho) tem a vantagem de mostrar as características positivas de cada componente, como no caso de filmes com adição de componentes hidrofóbicos, como os lipídeos e ácidos graxos que serão utilizados para atuar e exibir boas propriedades de barreira ao vapor de água, enquanto os componentes hidrofílicos como as proteínas exibirão boas barreiras ao gás e fornecerão boas propriedades mecânicas (FAKHOURIA *et al.* 2009). Alternativas tais como a adição de lipídios, quer sob a forma de uma emulsão ou em camada, já está sendo usada (FABRA *et al.* 2009; POMMET *et al.* 2003).

A absorção de vapor de água de um filme envolve a solubilização e a difusão de moléculas através da matriz deste. Devido à natureza hidrófila a partir de polissacarídeos e proteínas que são plastificados por água modificando a sua estrutura macromoleculares e assim, ambos os coeficientes de difusão e solubilidade se tornam altamente dependente das condições de umidade relativa durante o teste. Esta absorção por estes materiais depende tanto da estrutura química dos filmes e da sua morfologia (VILLALOBOS *et al.* 2006).

Davanço *et al.* (2007), estudou sobre a propriedade de barreira a água a qual fornece informações sobre a capacidade de ligação dos constituintes presentes nos filmes a uma umidade relativa ambiental determinada de água, e

é uma ferramenta útil para a análise do efeito sobre a permeabilidade ao vapor de água.

3.4.1 Filmes emulsionados

Os lipídios podem ser incorporados na matriz proteica pela formação de filmes emulsionados ou multicamadas. Nos filmes emulsionados, o material lipídico é disperso uniformemente na matriz hidrofílica, com auxílio de surfactantes (ANDREUCETTI *et al.* 2011; KOWALCZYK e BARANIAK, 2014).

A temperatura da emulsão deve ser superior à temperatura de fusão do lipídio, mas inferior a temperatura de volatilização do solvente da rede estrutural na produção deste tipo de filme (ANKER *et al.* 2001).

O uso de compostos hidrofóbicos adicionados como uma camada ou sob a forma de uma emulsão para plastificar as proteínas tem demonstrado ser eficaz na redução da permeabilidade ao vapor de água de filmes compostos (POMMET *et al.* 2003). Uma revisão sobre a utilização dos lipídios como plastificantes em filmes comestíveis já foi publicado (MORILLON *et al.* 2002; FAKHOURI *et al.* 2009).

Os filmes emulsionados têm recebido atenção da indústria de alimentos, uma vez que requerem apenas uma etapa de fabricação, ao contrário dos filmes laminados que necessitam de duas etapas ou mais (BRAVIN *et al.* 2004). As propriedades de barreira dos filmes emulsionados são influenciadas pela natureza do surfactante, tamanho e dispersão das gotas de lipídio formadas na matriz hidrofílica (PENG *et al.* 2013; TONGNUANCHAN *et al.* 2014).

O efeito dos lipídios e dos emulsificantes nas propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes emulsionados depende inicialmente da natureza e da concentração dos emulsificantes, como verificado por Bravin *et al.* (2004). Os autores verificaram maior homogeneidade dos glóbulos lipídicos e maior eficiência a barreira ao vapor de água com a maior solubilidade do surfactante no solvente aquoso. Segundo eles, a natureza do lipídio adicionado também pode afetar as estrutura dos filmes emulsionados formados.

O tamanho das gotas de lipídios influencia diretamente na estabilidade das emulsões e conseqüentemente nas propriedades dos filmes. Isso porque, a formação de gotas grandes pode levar a coalescência e floculação das

micelas lipídicas formadas, no qual o uso do surfactante é muito importante para ocorrer maior homogeneidade das gotas de lipídeos. Tongnuanchan *et al.* (2014) concluíram que dependendo do tipo de surfactante utilizado, este pode exercer grande influência na estrutura morfológica e molecular dos filmes compostos elaborados.

Bravinet *al.* (2004), verificaram que a solubilidade dos surfactantes em meio aquoso é um fator determinante na elaboração dos filmes, uma vez que a solução formadora é predominantemente polar. Com a melhor solubilização do surfactante é possível obter emulsões mais estáveis, com uma dispersão mais homogênea de lipídios na estrutura dos filmes, explicando a melhor barreira ao vapor de água dos filmes com YS (surfactante natural). Por outro lado, os ácidos graxos presentes na estrutura da lecitina podem atuar como lubrificantes da cadeia e aumentar sua flexibilidade.

Dependendo das características do sistema, o surfactante pode ainda exercer impacto negativo na estrutura dos filmes emulsionados. A presença de grupos hidrofílicos nos surfactantes pode promover a sorção de água na estrutura dos filmes, o que pode facilitar a permeação de água pelo filme. A organização do lipídio na matriz polimérica a interação entre esses componentes são considerados fatores críticos nas propriedades finais de filmes compostos ou emulsionados (GONTARD *et al.* 1994).

3.5 COMPOSTOS HIDROFÓBICOS NA ELABORAÇÃO DE FILME BIODEGRADÁVEIS

Coberturas e biofilmes a base de lipídios produzidos com ceras, óleos ou ácidos graxos são efetivos como barreira à umidade, devido ao seu caráter hidrofóbico. A adição desse componente provoca uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água dos filmes de biopolímeros que é dependente da relação hidrofóbico/hidrofílico fornecidas pelos seus componentes, além da polaridade, número e grau de insaturação ramificação apresentado pelas cadeias poliméricas da matriz utilizada (FAKHOURIA *et al.* 2009). Os filmes preparados com componente hidrofóbico também podem reduzir a abrasão da superfície do alimento durante o manuseamento e transporte. A incorporação de componente hidrofóbico surge como alternativa interessante e tem sido

estudada por vários pesquisadores como (DAVANÇO *et al.* 2007; ANDREUCETTI *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.* 2012).

Filmes e coberturas compostos ou de duas camadas estão sendo investigados, a fim de melhorar as características de permeabilidade, força, flexibilidade e valor nutricional (ANKER *et al.* 2001). A incorporação de substâncias não-polares ou hidrofóbicas, tais como óleos, gorduras e ácidos gordos, são comumente utilizadas para melhorar a propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes de biopolímeros hidrofílicos (PRODPRAN *et al.* 2007; LIMPISOPHON *et al.* 2010). Gordura e lipídios de diferentes tipos têm sido incorporados com sucesso em filmes à base de proteína por diferentes meios, incluindo o revestimento, laminação ou de múltiplas camadas e a dispersão ou emulsão para formar películas compósitas (ATARÉS *et al.* 2010b; GUERRERO *et al.* 2011; BAHRAM *et al.* 2014).

3.5.1 Ácidos graxos

Os lipídios têm diferentes propriedades físicas e químicas dependendo do tamanho da cadeia carbônica, do número e da posição das duplas ligações e linearidade (esteroespecificidade, *cis* e *trans*). Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 3 a 24 átomos de carbono, podem ser saturados ou insaturados. Por possuírem duplas ligações os ácidos graxos insaturados são considerados quimicamente instáveis. São denominados monoinsaturados quando possuem apenas uma dupla ligação, com duas ou mais duplas ligações, são chamados de polinsaturados (BELL, 1989).

Os benefícios da adição de ácidos graxos em filmes comestíveis foram pesquisados por vários autores. A permeabilidade ao vapor de água depende da relação hidrofóbica/hidrofílica proporcionada pelos componentes do filme e da polaridade, grau de insaturação e do grau de ramificação dos lipídios presentes no filme (GONTARD *et al.* 1994).

Ácido esteárico e os seus derivados têm sido estudados para a preparação das formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentares. É quimicamente ácido octadecanóico, um ácido graxo de cadeia de 18 carbonos (KARNNET *et al.* 2005). Os segmentos de hidrocarbonetos de cadeia longa de ácido esteárico podem atuar como plastificante para o sistema por ser um

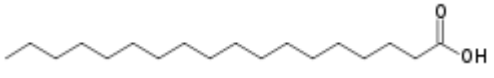
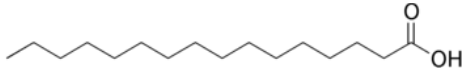
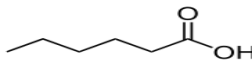
produto natural. Os filmes preparados a partir de proteínas de peixe e ácido esteárico não causam impacto ambiental drástico quando comparados os filmes preparados a partir de substâncias químicas sintetizadas (KARNNET *et al.* 2005).

Os ácidos esteárico, palmítico, mirístico e capróico, entre outros, cera de abelhas e óleos são atualmente utilizados como aditivos hidrofóbicos em formulações de filmes comestíveis devido às suas características altamente consideradas próprias para elaboração de filmes (ROJAS-ARGUDO *et al.* 2009). Segundo Caba *et al.* (2012) a adição de misturas de ácido palmítico-esteárico pode diminuir a permeabilidade a vapor de água (PVA) dos filmes. Também foi observado que ocorre uma menor absorção de água em filmes com a incorporação de ácido esteárico, não afetando a sua biodegradabilidade (LODHA e NETRAVAL, 2005).

A natureza química dos lipídios modifica as propriedades dos biofilmes, como o comprimento da cadeia carbônica, a polaridade afeta a inclusão dos componentes hidrofóbicos na solução filmogênica, onde quanto maior o número de carbonos na estrutura lipídica, mais difícil é a incorporação dos compostos lipídicos na solução protéica, por tanto necessitando de adição de surfactantes na solução. Por exemplo, o ácido araquídico (22C) possui maior permeabilidade ao vapor de água que os ácidos palmítico (16C) e esteárico (18C), o que pode ser explicado pelo fato de que a cadeia longa do lipídio sugere uma estrutura mais heterogênea (DAVANÇO *et al.* 2007).

Os ácidos graxos estudados neste trabalho estão representados na Figura 1.

Figura 1. Fórmula química dos ácidos esteárico, palmítico e capróico.

Ácido esteárico	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	
Ácido palmítico	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	
Ácido capróico	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$	

Fonte: BOBBIO e BOBBIO, 2003.

Ácidos graxos saturados são mais efetivos no controle de migração de umidade que os ácidos graxos insaturados. Fernández *et al.* (2007) verificaram que ácidos graxos saturados (esteárico, C18:0) foram mais eficientes na redução da migração ao vapor d'água em filmes de proteína de soro de leite que ácidos graxos insaturados (ácido oléico e linoleico, C18:1 e C18:2). Isso porque, os ácidos graxos insaturados apresentam um maior grau de mobilidade devido às duplas ligações do que os ácidos graxos saturados, o que favorece a difusividade molecular da água na estrutura.

3.6 SURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que contém uma parte hidrofílica e uma hidrofóbica (MIGUEL *et al.* 2009). Têm a capacidade de melhorar as propriedades funcionais dos filmes devido serem substâncias anfifílicas que interagem com sítios simultaneamente polares e apolares na proteína.

Ao adicionar um agente tensoativo (como são conhecidos também os surfactantes) na formulação dos filmes, os valores de permeabilidade à água devem diminuir devido à incorporação de componentes com algumas características hidrofóbicas (ZIANI *et al.* 2008). Ambos os tensoativos iônicos e não iônicos com ou sem adição de plastificantes foram estudados na produção de filmes (MORILLON *et al.* 2002; BRAVIN *et al.* 2004; RODRIGUEZ *et al.* 2006; VILLALOBOS *et al.* 2006) .

Os surfactantes são compostos que apresentam atividade na superfície da interface entre duas fases, tais como ar-água, óleo-água, e na superfície de sólidos (DAVANÇO *et al.* 2007). A parte apolar da molécula (cauda) dos compostos anfifílicos é composta por grupos hidrofóbicos. Esta parte da molécula tem uma baixa solubilidade em água devido ao “efeito hidrofóbico”. Os grupos polares não iônicos são hidrófilos (chamados de cabeça) mais fracos do que os grupos carregados, a sua energia de interação com a água é também inferior. No caso dos compostos anfifílicos não iônicos, os grupos polares não carregados são em geral maiores do que as caudas hidrofóbicas (ROCHA, 1999). A Figura 2 representa uma molécula de um surfactante.



Figura 2. Representação esquemática de um surfactante.

Fonte: (DAVANÇO, 2006).

Agentes emulsionantes ou surfactantes são freqüentemente necessários para melhorar a estabilidade das partículas de lipídios na matriz protéica (DAVANÇO *et al.* 2007). No entanto, existe pouca informação sobre o efeito de surfactantes em filmes emulsionados com ácidos graxos e proteína de peixe.

As moléculas ou os íons de surfactantes tendem a se aglomerar em micelas, grupos de molécula de tamanho coloidal. As caudas hidrofóbicas tendem a se reunir umas as outras enquanto as cabeças hidrofílicas proporcionam película externa protetora (ATKINS, 1997), conforme pode ser observado na Figura 3.

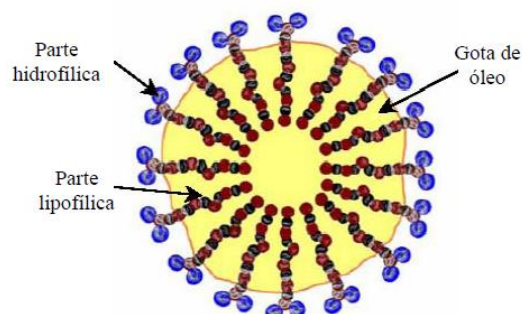


Figura 3. Representação gráfica de uma micela de surfactante resultando uma gota de óleo.

Fonte: (DAVANÇO, 2006).

O nome oficial é mono dodecil sulfato, mas comumente chamado de dodecil sulfato de sódio (SDS), lauril sulfato de sódio (LSS) (Figura 4), apresenta ação emulsificante, de fórmula: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{-CH}_2\text{-O-(SO}_3\text{)}_1\text{-Na}^{1+}$, solúvel em dez partes de água, formando uma solução ligeiramente opaca, tem forma de pequenos cristais brancos ou amarelados com leve odor característico. O SDS possui uma cadeia alquílica longa, praticamente insolúvel

em água, ligada covalentemente a um grupo iônico, o sulfato de sódio. Usado como tensoativo nos produtos de limpeza doméstica (DAVANÇO, 2006).

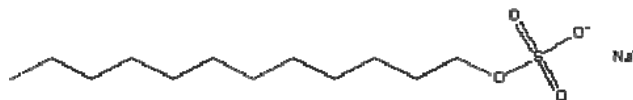


Figura 4. Estrutura do SDS

Fonte: (DAVANÇO, 2006).

A concentração onde inicia o processo de formação das micelas (micelização) é chamada de concentração crítica micelar, CMC é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. Na Figura 5 pode-se observar um esquema do processo de micelização do SDS:

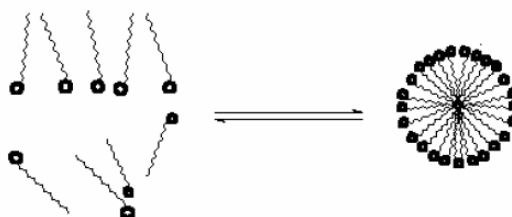


Figura 5. Ilustração do processo de micelização do SDS em solução aquosa. Na CMC os monômeros livres encontram-se em equilíbrio com o SDS micelizado (MINATTI, 2005).

Alguns estudos revelaram que os tensoativos podem melhorar a molhabilidade e a estabilidade das dispersões (GHEBREMESKEL *et al.* 2007; CHEN *et al.* 2009) e melhorar as propriedades de barreira de vapor de água (VILLALOBOS *et al.* 2006).

Vieira *et al.* (2011) verificaram que o surfactante adicionado sem glicerol, teve um efeito significativo sobre as propriedades mecânicas, mas não alterou significativamente as propriedades de barreira de vapor de água. No entanto, quando o agente tensoativo foi adicionado com glicerol, provocou uma redução na resistência à tração e um aumento na alongação e na permeabilidade à vapor de água. Davanço *et al.* (2007), observou um efeito sinérgico do

surfactante com os ácidos graxos assim como Oliveira *et al.* (2012) com surfactante e glicerol na permeabilidade ao vapor de água.

Portanto, a preparação de películas de emulsão requer geralmente tensoativo adequado, de modo a provocar o estado estável do sistema de emulsão de duas fases com a homogeneidade da distribuição de gotículas de óleo. Diferentes surfactantes incorporados contribuiriam para estrutura ou morfologia dos filmes (distribuição de gotículas de óleo) e propriedades do filme de forma diferente (TONGNUANCHAN *et al.* 2014). Prodpram *et al.* (2007) elaborou filme biodegradável à base de proteínas do músculo de peixe contendo óleo de palma, em que Tween-20 foi utilizado como tensoativo. Já Davanço *et al.* (2007) preparou filmes compostos a base de gelatina utilizando como surfactante lauril sulfato de sódio (SDS) e o Tween 80.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foi utilizado subproduto do processamento de filetagem da pescada amarela (*Cynoscionacoupa*) como matéria-prima proveniente da indústria Pesqueira ECOMAR S/A localizada em Vigia-PA. Também foi utilizado hidróxido de sódio P.A (NaOH -Isofar) para ajustar o pH, cloreto de sódio P.A (NaCl - Isofar) para extração das proteínas miofibrilares, ácido meta-fosfórico P.A/ACS (HPO_3 - Neon) para desodorização da matéria-prima, glicerol P.A ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$) - Isofar como plastificante, Lauril Sulfato de Sódio P.A (SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$) - Dinâmica) como surfactante e os ácidos graxos: ácido esteárico ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ - Isofar), palmítico PS ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ - Vetec) e capróico P.S ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$ - Vetec), adquiridos em empresas nacionais.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do subproduto de pescada amarela

O subproduto (resíduos) de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) foram embalados, acondicionados em caixa térmica com gelo e transportados para o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) da Universidade Federal do Pará. No laboratório o músculo aderido à pele foi separado de ovas, ventrechas, espinhas. O músculo obtido foi lavado em água clorada (5 ppm) a 4°C por 5 minutos, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em freezer a -18 °C.

4.2.2 Obtenção das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML)

Para a obtenção das PML, foi utilizada a metodologia de Zavareze *et al.* (2012) com modificações. O músculo triturado e o ácido metafosfórico (HPO_3) a 0,05% (4-5 °C) foram misturados na proporção de 1:3 (músculo:ácido), para desodorizar a matéria-prima. Esta mistura foi filtrada através de uma camada de tecido faillet, adicionado três volumes de água destilada (4°C) para retirar

excesso do HPO_3 , em homogeneizador (modelo TE-102, Tecnal) a 10.000 rpm por 2 min/4°C. Em seguida filtrado novamente para retirar as frações das proteínas solúveis em água (sarcoplasmáticas).

O filtrado foi homogeneizado manualmente com 5 volumes de NaCl (50 mM) por 5 minutos para separação das proteínas miofibrilares seguida de filtração (tecido failet), sendo repetido por duas vezes. Nas etapas de filtração foram retiradas as proteínas do estroma retidas com o auxílio de uma espátula. Após essa etapa, o material obtido foi submetido ao processo de congelamento (-22°C) por 24h para ser liofilizado por 48h (marca Liotop – modelo L101), triturado, peneirado (22 mesh), embalado a vácuo e armazenado a temperatura 19-23 °C para posterior uso, Figura 6.

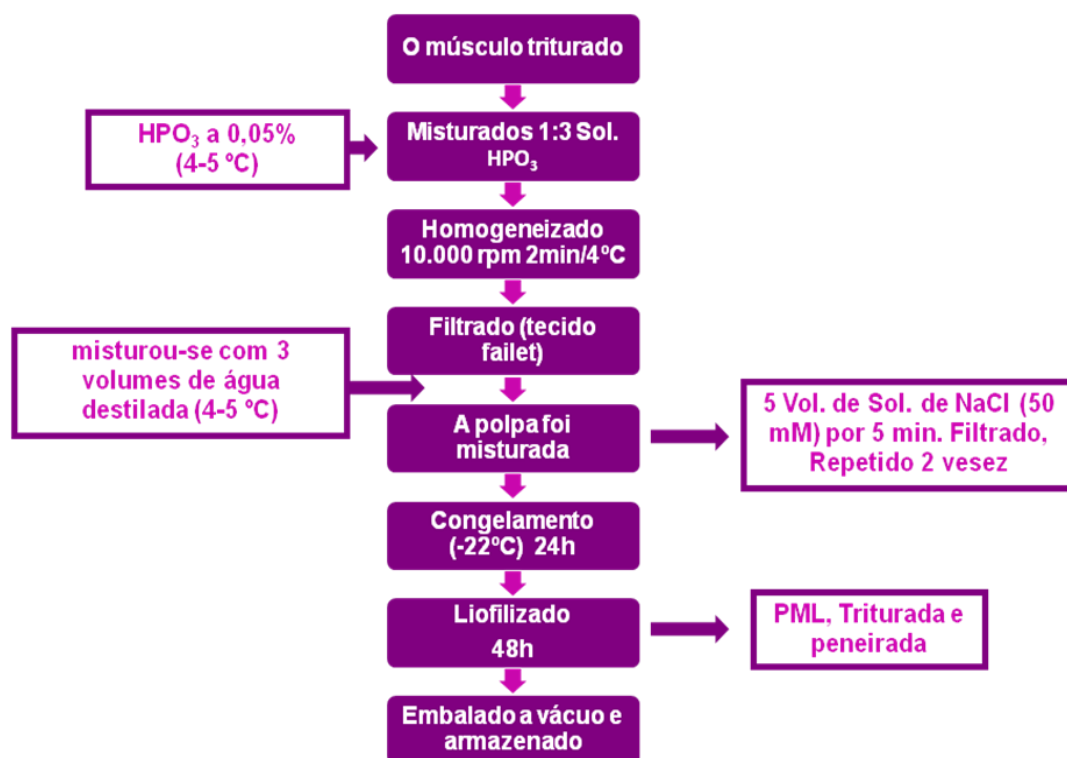


Figura 6. Fluxograma de obtenção das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML).

4.2.3 Determinação do rendimento do músculo de peixe (MP) e da extração da Proteína Miofibrilar Liofilizadas (PML)

Os rendimentos do MP do subproduto (músculo aderido à pele de peixe) e da extração da PML foram calculados através das Equações 1 e 2 e expressos em kg de músculo/kg de subproduto e g de proteína liofilizada/g de

músculo de peixe (após extração da proteína miofibrilar), respectivamente (ARNESEN e GILDBERG, 2007; BINSI *et al.* 2009; BORAN e REGENSTEIN, 2009; BENJAKUL *et al.* 2010).

$$\text{Produção de MP (\%)} = \frac{\text{Peso do músculo de peixe (kg)}}{\text{Peso do subproduto (kg)}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{Produção de PML (\%)} = \frac{\text{Peso da proteína liofilizada (g)}}{\text{Peso do músculo de peixe (g)}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

4.2.4 Caracterização das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML)

4.2.4.1 Composição Centesimal das PML

As análises de umidade, cinzas, proteína bruta e lipídios foram realizadas nas proteínas miofibrilares liofilizadas, segundo metodologia da AOAC (2000). As análises foram feitas em triplicata e expressos em base seca.

4.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das PML (MEV)

A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – LABMEV do Instituto de Geociências da UFPA. O equipamento utilizado foi um MEV modelo LEO-1430. A amostra foi metalizada com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 minutos. As condições de análises para as imagens de elétrons secundários foram: corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kv, distância de trabalho = 15 mm.

4.2.5 Ensaios preliminares para elaboração dos filmes

Para estabelecer a melhor incorporação dos ácidos graxos e o surfactante à solução de proteína durante a elaboração dos filmes (tópico 4.2.6) e para obter filmes com os melhores aspectos visuais foram realizados ensaios preliminares, sendo testadas as soluções filmogênicas sob agitação mecânica (modelo TE-102, Tecnal) nas velocidades de 7.000, 10.000 e 14.000

rpm, e avaliados no microscópio óptico o aspecto e tamanho das gotas de emulsão formadas e a homogeneidade da solução.

A concentração de glicerol utilizada inicialmente foi de 50% de acordo com Zavareze et al. (2012), também foram feitos outros ensaios nas concentrações de 35% e 40%. Os ácidos graxos e o surfactante foram definidos segundo Davanço et al. (2007), com concentrações dos ácidos de 5 e 10% e do surfactante de 5, 10, 20, 40, 50 e 60%.

Após essas etapas foram realizados testes com variação de temperatura do banho termostático de 50, 60 e 70°C e temperatura de secagem de 26 – 30 °C em D.B.O com circulação de ar.

Cada formulação utilizou-se 120 ml de solução filmogênica de acordo com Zavareze et al. (2012) para padronizar a espessura final dos filmes secos. Após definir as condições das soluções filmogênicas para a formação adequada dos filmes, os mesmos foram caracterizados quanto à cor, transparência, propriedades de barreira e mecânicas, solubilidade em água e microscopia.

4.2.6 Elaboração dos filmes biodegradáveis

Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia de Zavareze et al. (2012) e Davanço et al. (2007) com modificações, onde os filmes com proteínas miofibrilares liofilizadas foram preparados por suspensão da proteína (p/v) (método de casting), sendo ajustado o pH (modelo HI 221) da solução para 11,0 com NaOH 2 M. Foram adicionados às soluções de proteínas, os ácidos graxos (esteárico, palmítico e capríco) e o surfactante Lauril Sulfato de Sódio - SDS, utilizando glicerol como plastificante, no qual foram elaborados (Figura 7) filmes com diferentes concentrações Tabela 1, Figura 8.

As soluções foram homogeneizadas (TE-102, Tecnal) com uma velocidade de 10.000 rpm durante 5 minutos. Em seguida as mesmas foram tratadas termicamente com o auxílio de banho termostático (TE-057, Tecnal) durante 30 minutos a 70 °C para permitir a formação dos filmes.

As soluções filmogênicas (120 ml) foram espalhadas em recipientes de silicone (22 cm de diâmetro/2,5 cm de altura), sendo secas em incubadora

D.B.O com circulação de ar a 26°C por 17 horas. Após a secagem, os filmes foram embalados à vácuo e acondicionados a 25 °C.

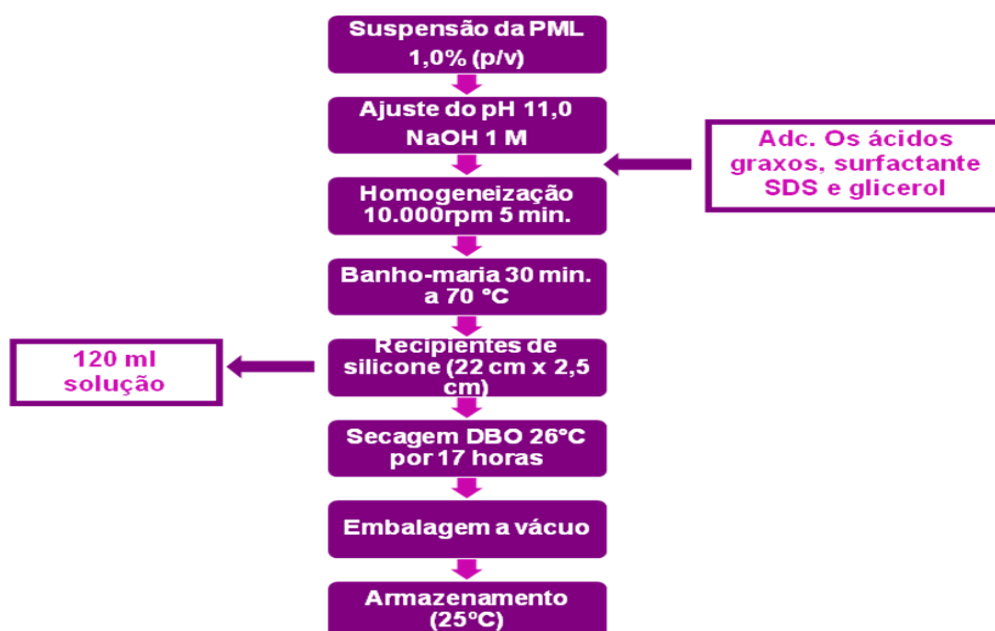


Figura 7. Fluxograma de elaboração dos filmes biodegradáveis

Tabela 1. Percentual das composições utilizadas na elaboração dos filmes biodegradáveis.

Amostras	Proteína miofibrilar liofilizada (%)	Glicerol (%)	Ácido esteárico (%)	Ácido palmítico (%)	Ácido capróico (%)	SDS (%)
PML	1	50	-	-	-	-
PML /5%AE	1	50	5	-	-	-
PML /5%AP	1	50	-	5	-	-
PML /5%AC	1	50	-	-	5	-
PML /10%AE	1	50	10	-	-	-
PML/10%AP	1	50	-	10	-	-
PML/10%AC	1	50	-	-	10	-
PML/5%AE/5%SDS	1	50	5	-	-	5
PML/5%AP/5%SDS	1	50	-	5	-	5
PML/5%AC/5%SDS	1	50	-	-	5	5
PML/5%AE/10%SDS	1	50	5	-	-	10
PML/5%AP/10%SDS	1	50	-	5	-	10
PML/5%AC/10%SDS	1	50	-	-	5	10
PML/10%AE/20%SDS	1	50	10	-	-	20
PML/10%AP/20%SDS	1	50	-	10	-	20
PML/10%AC/20%SDS	1	50	-	-	10	20

PML: Proteína miofibrilar liofilizada; AE: Ácido esteárico; AP: Ácido palmítico; AC: Ácido capróico; SDS: Lauril sulfato de sódio.

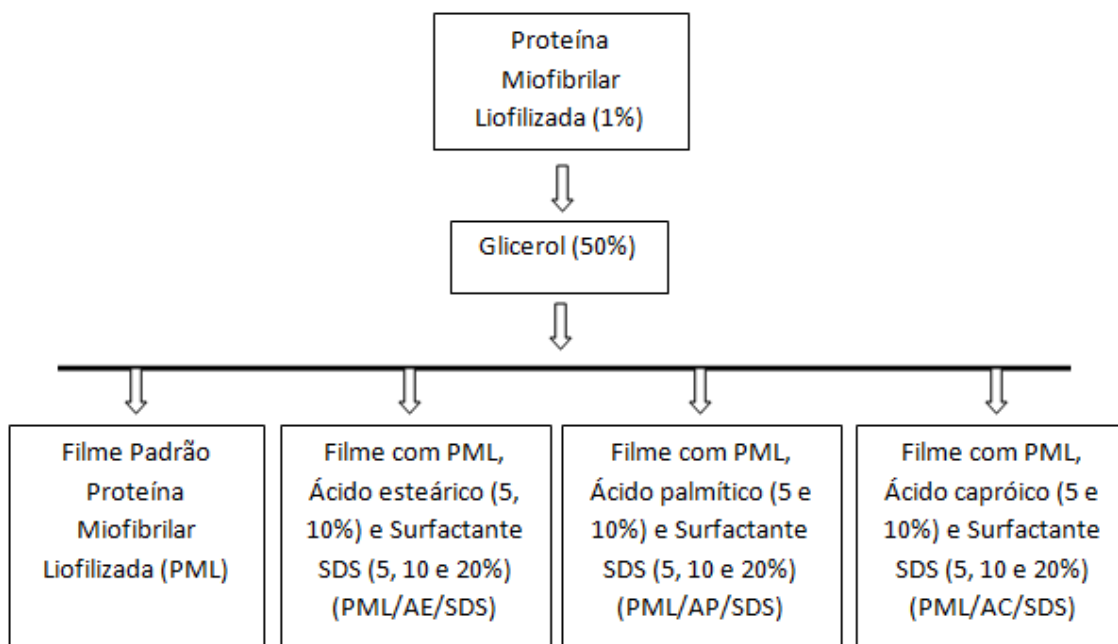


Figura 8. Concentrações utilizadas na elaboração dos filmes à base de proteína miofibrilar liofilizada (PML), ácidos graxos (esteárico, palmítico e capríco) e surfactante (laurilsulfato de sódio – SDS).

4.2.7 Caracterização dos filmes biodegradáveis

4.2.7.1 Aspecto Visual

Os filmes selecionados através de análises visuais após a secagem foram os que apresentaram coloração homogênea, menor presença de partículas, rupturas ou zonas quebradiças e oleosidade, com fácil retirada do filme do suporte, possibilitando bom manuseio. Foram descartados os filmes e formulações que não apresentaram essas características.

4.2.7.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada por meio da média de oito medidas aleatórias sobre a área do filme, obedecendo a um afastamento da borda do filmes de 10 mm utilizando micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, IP54, São Paulo, Brasil) (ZAVAREZE *et al.* 2012). Esta medida foi obtida após a secagem a 25°C e acondicionamento dos filmes antes da realização das análises.

4.2.7.3 Cor

A cor dos filmes foi determinada com colorímetro controlado pelo programa Universal Software 3.2, trabalhando com D_{65} (luz do dia) e usando-se os padrões CIE Lab: L^* , variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo (+). Os filmes foram aplicados na superfície de uma placa branca padrão e os padrões L^* , a^* e b^* foram medidos. A diferença de cor (ΔE^*) foi calculada de acordo com a Equação 3 (GENNADIOS *et al.* 1996).

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde: ΔL^* , Δa^* e Δb^* são os diferenciais entre os cromas das amostras e do padrão branco: $L^* = 92,24$; $a^* = -5,15$; $b^* = 6,11$.

4.2.7.4 Transmissão da luz e valor de transparência

A transmitância de luz dos filmes foi medida na gama do visível e ultravioleta (200-800nm) usando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Quioto, Japão), de acordo com o método do Shiku *et al.* (2004). A análise foi realizada em triplicata e o valor de transparência do filme foi calculado usando-se a Equação 4 (HAN e FLOROS, 2010).

$$\text{Valor de transparência} = \frac{-\log T_{600}}{x} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde: T_{600} é a transmitância a 600 nm; x representa a espessura filme (mm). O maior valor de transmitância representa a menor transparência do filme.

4.2.7.5 Propriedade de barreira

Utilizando um método modificado ASTM (American Society for Testing and Materials, 1989), como descrito por Shiku *et al.* (2004) foi medido a permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes. Os mesmos foram selados em Becker de permeação de vidro contendo sílica gel seco (0% UR; 0 Pa de

pressão de vapor de água a 30 °C) com cola de silicone (adesivo de silicone, alta temperatura – Siloc). Os beakers foram colocados em dessecadores contendo água destilada a 30 °C (99% de UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor a 30 °C) e foram pesados em intervalos de 1 h ao longo de um período de 10 h. O PVA dos filmes foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \frac{l}{A \Delta P} \quad Eq. 5$$

Onde: PVA: permeabilidade ao vapor de água ($\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{KPa}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$); w representa o ganho de peso do becker (g); l é a espessura do filme (mm); t é o tempo de ganho (d); A é a área da superfície do filme exposto (m^2); ΔP é a diferença de pressão de vapor através da película (4,2449 KPa, a 30 °C).

4.2.7.6 Solubilidade em água

A análise de solubilidade em água (SOL%) dos filmes foi realizada em triplicata seguindo o método proposto por Gontard *et al.* (1994). Inicialmente, três discos de cada amostra de filme com 2 cm de diâmetro, foram imersos em 50ml de água destilada, mantidos sob agitação a uma velocidade de 150 rpm por 24 h em Incubadora Shaker (Lucadema, Luca-223) à temperatura ambiente (25°C). Após este período, as amostras foram removidas da incubadora e secas em estufa (105°C por 24 horas) para determinação da massa seca que não se dissolveu em água. O cálculo da solubilidade foi realizado de acordo com Equação 6.

$$SOL (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad Eq. 6$$

Onde: SOL (%): porcentagem de material solubilizado; M_i : massa inicial da amostra (g); M_f : massa final da amostra (g).

4.2.7.7 Propriedades mecânicas

Foi empregada a metodologia ASTM D882-91 (ASTM, 1996) para verificar a resistência à tração e alongação na ruptura dos filmes utilizando um texturômetro. As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (25 °C).

As amostras foram cortadas em tiras de 100 mm de comprimento e 25 mm de largura. A distância máxima que o texturômetro foi programado foi de 100 mm. A resistência à tração (RT) e a porcentagem de alongação (%E) foram calculadas pelas Equações 7 e 8, respectivamente.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad Eq.7$$

Onde: RT: resistência à tração (MPa); F_m: força máxima no momento da ruptura do filme (N); A: área da secção transversal do filme (m²).

$$E(\%) = \frac{d_{final}}{d_{inicial}} \times 100 \quad Eq.8$$

Onde: E: alongação (%); d_f: distância final no momento da ruptura (cm); d_{inicial}: distância inicial de separação (5 cm).

4.2.7.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – LABMEV do Instituto de Geociências da UFPA no equipamento MEV modelo LAO- 1430. As amostras foram metalizadas com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 minutos. Condições de análises para as imagens elétrons secundários: corrente do feixe de elétrons = 90 µA, voltagem de aceleração constante = 10 kv, distância de trabalho = 15mm.

4.2.8 Análise Estatística

Os dados da caracterização dos filmes obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação das médias de Tukey, ao nível de 5% (p≤0,05) de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA 7 for Windows.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DO MÚSCULO DE PEIXE (MP) E DA PROTEÍNA MIOFIBRILAR LIOFILIZADA (PML)

O valor do rendimento do processo de obtenção do músculo de peixe (MP) obtido do subproduto foi 40% e o rendimento do processo de obtenção da proteína miofibrilar liofilizada foi de 15,21%. O aumento da concentração da proteína miofibrilar essencial na formação de filmes biodegradáveis ocorre no processo de lavagem. Segundo Zavareze *et al.* (2012), a importância da lavagem consiste na remoção das proteínas solúveis em água (sarcoplasmáticas), resultando no aumento da concentração da proteína miofibrilar (actomiosina), o que pode melhorar força de gel e a elasticidade. Pessatti (2001) obteve-se um rendimento menor que 14% ao elaborar um concentrado protéico de peixe, através de lavagens sucessivas com etanol, podendo ser considerado satisfatório o rendimento da PML obtido neste trabalho.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML)

5.2.1 Composição Centesimal do músculo de peixe e das PML

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da composição centesimal do músculo obtido do subproduto da pescada amarela e das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML).

Tabela 2. Composição centesimal do músculo de peixe e da proteína miofibrilar liofilizada (PML).

Análises	Músculo de peixe	(PML)
Proteínas (%)	16,04±0,87	82,89±1,68
Lipídeos (%)	0,40±0,004	2,19±0,15
Umidade (%)	82,67±0,40	7,79±0,12
Cinzas (%)	0,53±0,001	3,81±0,02

Foi obtida quantidade bastante elevada de proteínas miofibrilares devido ter sido utilizada uma baixa concentração de cloreto de sódio, em torno de 0,05M. García e Sobral (2005) encontraram 80% de proteínas miofibrilares liofilizadas em tilápia-do-nilo. Devido à aplicação do processo de liofilização houve um aumento de 80,65% da concentração da proteína miofibrilar e redução em 90,58% do conteúdo de umidade em relação aos valores do músculo de peixe.

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das PML (MEV)

Foram observados nas proteínas miofibrilares liofilizadas de pescada amarela, através da MEV, um conjunto desordenado de partículas de tamanhos heterogêneos (Figura 9A) e uma estrutura protéica que apresentou superfície heterogênea, com rachaduras e lacunas (Figura 9B),

A proteína apresentou estrutura com fissuras, não lisa, com partículas quebradiças, provavelmente, devido à etapa de trituração (estresse mecânico), que pode ter modificado a estrutura nativa da mesma. Há uma desorganização na conformação, alterando as propriedades das proteínas, pois a agitação e trituração rompem o equilíbrio de forças que mantém a estrutura protéica, não interferindo na formação dos filmes. Segundo Haque *et al.* (2015) a desnaturação de proteínas durante o processamento geralmente reduz a sua eficácia funcional e nutricional. No entanto, um certo grau de processamento é essencial para prolongar o prazo de validade e para utilizar estas proteínas como ingredientes. A desnaturação ou a incorporação de aditivos que promovem a formação de ligações cruzadas resultam em maior ordenação molecular, e conseqüentemente, maior coesão e rigidez dos filmes (GUILBERT *et al.* 1997).

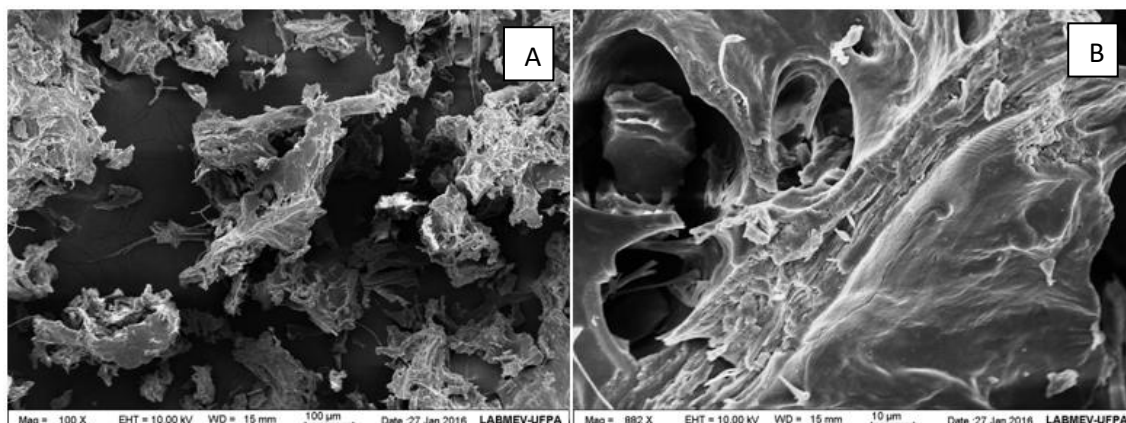


Figura 9. Microfotografia da proteína miofibrilar liofilizada de pescada amarela. Ampliação de 100X(A) e 882X(B).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS

5.3.1 Ensaios preliminares para elaboração dos filmes

Os filmes obtidos a partir das soluções filmogênicas submetidas à agitação mecânica com as rotações de 7.000 e 14.000 rpm foram excluídos do trabalho, devido não apresentar homogeneidade das partículas e formação intensa de espuma (formada devido a desnaturação da proteína em pH11 e trituração das proteínas nas soluções filmogênicas adicionadas de ácidos graxos e surfactante SDS), permanecendo os ensaios com a agitação mecânica de 10.000 rpm que apresentaram aspecto e tamanho das gotas de emulsão uniformes e homogeneidade da solução.

Em relação ao percentual de glicerol quando utilizado as menores concentrações de 35% e 40% nos filmes contendo os ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante SDS, os filmes apresentaram pouca elasticidade, sendo selecionada a concentração de 50% para dar continuidade aos experimentos.

As melhores formulações foram selecionadas avaliando os sistemas visualmente através da identificação da solubilização mais efetiva dos compostos hidrofóbicos (ácidos esteárico, palmítico e capróico) e do surfactante SDS, isto é, nas situações em que as soluções filmogênicas após tratamento térmico e os filmes secos encontravam-se transparentes. Observou-se que nos filmes elaborados com as maiores concentração de surfactante (40,

50 e 60%) formaram-se filmes visivelmente mais opacos e esbranquiçados, sendo assim, as concentrações definidas foram com 5% e 10% dos ácidos graxos e 5%, 10% e 20% do surfactante, para todas as formulações.

Nas etapas de tratamento térmico e secagem dos filmes, não ocorreu formação adequada quando foram utilizados os ácidos de maior cadeia (esteárico e palmítico) nas soluções filmogênicas, submetidas às temperaturas mais baixas do banho termostático (50% e 60%), devido à temperatura ser menor que a do ponto de fusão dos ácidos, desta forma, fixou-se a temperatura de 70 °C, padronizada para todos os ensaios. Em relação à secagem, os filmes demoravam menor tempo para secarem, em torno de 15h, quando secos em maior temperatura, apresentavam-se ressecados e quebradiços, fixando-se então 26 °C por 17h.

5.3.2 Aspecto visual

Os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual onde foi verificada a presença de pequenas partículas na menor concentração dos ácidos graxos (5%) com 5 e 10% de SDS, porém, não apresentaram presença de rupturas e fragilidade. Os ensaios com as maiores concentrações dos ácidos graxos (10%) com (20%) de SDS, apresentara-se esbranquiçados. Os filmes com adição de ácido capróico apresentaram maiores dificuldades de manuseio e de retirada do suporte utilizado na secagem.

Os filmes selecionados elaborados com os ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante (lauril sulfato de sódio – SDS), de um modo geral, apresentaram aspecto uniforme, brilhante, certa maleabilidade e visivelmente homogêneos.

5.3.3 Cor

Os parâmetros de cor (L^* , b^* e ΔE) dos filmes produzidos com proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactantes (SDS) estão apresentados na Tabela 3. Todos os filmes apresentaram alta luminosidade, no entanto, os filmes contendo somente ácidos graxos em todas as concentrações

foram os que apresentaram maiores valores de luminosidade (L^*) quando comparados ao filme elaborado apenas com proteína miofibrilar (PML) e aos filmes acrescentados de surfactante SDS, apresentando dessa forma diferença significativa ($p \leq 0,05$), demonstrando a contribuição positiva da adição dos ácidos graxos nos filmes elaborados.

Os filmes com o surfactante SDS, não apresentaram diferença ($p \leq 0,05$), quando comparados aos que continham apenas proteína miofibrilar (PML) para o parâmetro L^* , indicando que as adições dos ácidos graxos com o surfactante nessas concentrações não interferiram de forma negativa na luminosidade dos filmes elaborados.

Os filmes contendo somente ácidos graxos apresentaram coloração amarelada (b^*) com diferença ($p \leq 0,05$) quando comparados aos demais ensaios. Ao adicionar os ácidos e o SDS nas soluções filmogênicas, pode-se evitar a ocorrência da reação de Maillard, devido à reação com o grupo amino (Limpan *et al.* 2012), indicando que o SDS contribuiu de forma positiva na coloração dos filmes.

A tendência amarelada do filme também pode estar associada à quantidade de lipídeos presentes, ainda que em pequena quantidade na proteína miofibrilar liofilizada. De acordo com Tongnuanchan *et al.* (2011a) no processo de lavagem pode-se remover lipídeos e alguns pró-oxidantes (hemoglobina e mioglobina), mas alguns lipídeos ainda permanecem no músculo depois de lavado e triturado. A sua remoção pode reduzir a oxidação, retardando desse modo a formação do composto carbonilo na reação de Maillard.

Assim como, também poderia ser devido à condição alcalina que pode induzir a formação de pigmento amarelado, especialmente por via da reação de Maillard, o pH alcalino favorece a formação redutonas sobre a produção de furfural a partir dos produtos de Amadori, que conduz ao desenvolvimento de cor em filmes (TONGNUANCHAN *et al.* 2011b). O mesmo comportamento para o atributo b^* (coloração amarelada) foi encontrado por Hananig (2013) utilizando gelatina obtida de peixe com adição de componente lipídico.

Tabela 3. Cor dos filmes de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capríco) e surfactante SDS

Tipos de Filmes	L*	b*	ΔE
PML	89,64±0,02 ^{be}	6,18±0,39 ^{bf^g}	2,62±0,04 ^b
PML/5%AE	92,81±0,23 ^{cd}	10,90±0,11 ^{ac}	4,83±0,10 ^c
PML/5%AP	92,09±0,07 ^c	12,35±0,05 ^a	6,24±0,05 ^a
PML/5%AC	93,42±0,41 ^{ad}	11,18±0,28 ^{ac}	5,22±0,18 ^{cd}
PML/10%AE	93,86±0,38 ^{ad}	11,80±0,65 ^{ac}	5,94±0,54 ^{a,d}
PML/10%AP	93,59±0,49 ^{ad}	12,23±0,47 ^{ac}	6,28±0,37 ^a
PML/10%AC	94,18±0,54 ^a	10,68±0,59 ^c	4,99±0,37 ^c
PML/5%AE/5%SDS	89,79±0,36 ^{be}	5,85±0,16 ^{bd^g}	2,47±0,35 ^b
PML/5%AP/5%SDS	89,50±0,03 ^{be}	6,13±0,36 ^{bg}	2,76±0,03 ^b
PML/5%AC/5%SDS	89,51±0,08 ^{be}	6,11±0,20 ^{bg}	2,73±0,08 ^b
PML/5%AE/10%SDS	89,43±0,51 ^{be}	5,64±0,74 ^{bd}	2,91±0,56 ^b
PML/5%AP/10%SDS	89,61±0,18 ^{be}	4,62±0,34 ^{bd}	3,03±0,21 ^b
PML/5%AC/10%SDS	90,34±0,90 ^b	4,49±0,82 ^d	2,67±0,30 ^b
PML/10%AE/20%SDS	89,64±0,20 ^{be}	7,03±0,89 ^{fg}	2,85±0,21 ^b
PML/10%AP/20%SDS	89,19±0,18 ^e	7,26±0,32 ^g	3,27±0,23 ^b
PML/10%AC/20%SDS	89,49±0,23 ^{be}	6,32±0,82 ^{fg}	2,83±0,32 ^b

PML: Proteína miofibrilar liofilizada; AE: Ácido esteárico; AP: Ácido palmítico; AC: Ácido capríco; SDS: Lauril sulfato de sódio. Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Os dados obtidos neste estudo indicam que os filmes de proteína com adição de ácidos graxos (esteárico, palmítico e capríco) e surfactante SDS apresentam apresentaram alta luminosidade e coloração adequada para sua utilização como embalagem. Filmes elaborados por Blanco-Pascual et al. (2014) apresentaram baixa luminosidade ($L^* = 34,73$), quando comparado a este estudo, em filmes obtidos sob condição básica ao trabalharem com proteína miofibrilar de pescado (*Dosidicus gigas*), e tendência para cor amarelada quando em condições ácidas depois de quatro meses de armazenamento. Segundo Rhim et al. (2002), filmes de isolado protéico de soja contendo diferentes quantidades de SDS (10, 20 e 40%) apresentaram aparência mais amarelada que os filmes sintéticos, o autor atribuiu a cor do SDS, mas que não foi considerada prejudicial visualmente.

A Tabela 3 mostra o resultado do ΔE que indica a magnitude da diferença total de cor entre os parâmetros analisados (L^* e a^*), onde os filmes contendo ácidos graxos e surfactante SDS não apresentaram diferença significância quando comparado com a amostra padrão (PML), não obstante houve diferença ($p \leq 0,05$) para os filmes elaborados apenas com os ácidos graxos quando comparados aos filmes com SDS e ao filme PML.

5.3.4 A transmissão da luz e valor de transparência

A transmissão de luz em intervalos de UV (200 – 280) e visível (350 – 800) no comprimento de onda selecionado, bem como a transparência (T_{600}/nm) estão apresentadas na Tabela 4.

A transparência dos filmes é influenciada pela estrutura da emulsão, volume de lipídios dispersos e com a estrutura interna desenvolvida durante a secagem dos filmes (VILLALOBOS *et al.* 2005). Observa-se que filmes contendo apenas ácidos graxos quando utilizados em concentrações mais altas (10%) apresentaram filmes menos transparentes (o bloqueio da passagem de luz caracteriza a baixa transparência de um material) apresentando diferença ($p \leq 0,05$) quando comparados ao filme PML. Este efeito pode ser explicado pela dispersão da luz devido à presença de gotas de emulsão do componente lipídico na matriz protéica. A incorporação de componentes lipídicos tem impacto direto na aparência do filme, tornando-os menos transparentes (mais opacos) (CERQUEIRA *et al.* 2012; TONGNUANCHAN *et al.* 2014).

Zahedi *et al.* (2010) atribuiu menor transparência em filmes compostos de proteína de pistache e lipídios (ácido palmítico e esteárico) ao estado sólido do ácido graxo em temperatura ambiente. Wang *et al.* (2014) observaram que o aumento da concentração de ácidos graxos (oléico e esteárico) na matriz proporcionaram filmes de proteína isolada de soja significativamente menos transparentes, e atribuiu esse efeito a dispersão da luz pelas gotas de emulsão e a sua distribuição contínua na rede do polímero. Bertan *et al.* (2005) observou que o aumento das concentrações hidrofóbicas adicionadas (ácidos esteárico, palmítico, láurico e blenda de componentes hidrofóbicos) a formulação de filmes composto de gelatina proporcionou filmes menos transparentes.

Segundo Taqi (2011), a transparência pode ser fortemente relacionada com a migração do componente hidrofóbico durante a preparação do filme, o que pode ser visualizado como um aspecto turvo dos filmes com redução ou perda de sua transparência.

Nos filmes contendo SDS, observou-se que com o aumento da concentração (5, 10 e 20%) e dos ácidos graxos de 5 para 10% ocorreu um aumento no valor de transparência de forma significativa ($p \leq 0,05$), proporcionando filmes menos transparentes, exceto para o filme com ácido esteárico. Não obstante, a presença do surfactante SDS proporcionou melhor interação com a matriz protéica e os ácidos palmítico e capróico nas menores concentrações (%5 para os ácidos e SDS) obtendo filmes significativamente mais transparentes comparados aos filmes com SDS. A transparência e a opacidade do polímero estão relacionadas com a composição da matriz, bem como a organização e ao rearranjo dos componentes na matriz (VILLALOBOS *et al.* 2005).

Davanço *et al.* (2007), encontrou comportamento semelhante a este estudo, onde a transparência dos filmes composto de gelatina foi afetada pela adição de surfactante SDS nas matrizes protéica (gelatina) contendo ácidos esteárico e capróico. Outros autores também verificaram que o surfactante contribui para melhorar a transparência de filmes compostos dependendo da concentração do mesmo e homogeneidade dos componentes (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* 2009; CHEN *et al.* 2009).

Os filmes exibiram a menor transmissão na gama dos UV (200-280 nm), o que segundo Blanco-Pascual *et al.* (2014) filmes exibem menor transmissão de luz no espectro ultravioleta, o que pode ser levado em consideração para evitar a oxidação dos alimentos. Desta forma, todos os filmes elaborados neste trabalho têm excelentes propriedades de barreira contra a luz UV na gama de 200-280 nm.

Os filmes contendo apenas 10% de ácido esteárico e palmítico, bem como os filmes com 10% dos ácidos esteárico, palmítico e capróico, com 20% de surfactante SDS, foram os que apresentaram melhores propriedades de barreira na faixa do visível (350 – 800nm). Segundo Limpan *et al.* (2012), filmes que apresentam menor propriedade de barreira contra a luz visível são os que apresentam maior transmitância (%T).

Tabela 4. A transmissão de luz e a transparência dos filmes de proteína, ácido esteárico, palmítico e caprótico e surfactante SDS.

Tipos de Filmes	T% Valor de Transmitância (nm)								Valor de Transparência
	200	280	350	400	500	600	700	800	
PML	0,1	0,2	65,8	70,3	74,5	74,9	77,6	76,1	2,0±0,28 ^{bd}
PML/5%AE	0,1	1,0	73,7	77,0	80,7	81,0	83,3	82,2	2,1±0,04 ^{bd}
PML/5%AP	0,1	0,4	71,1	75,1	79,7	80,0	82,4	81,4	1,7±0,06 ^{bc}
PML/5%AC	0,1	0,5	72,2	76,0	79,6	79,6	79,5	80,7	1,6±0,09 ^{bc}
PML/10%AE	0,1	2,5	61,4	64,7	69,1	69,1	73,2	71,6	4,5±0,00 ^a
PML/10%AP	0,1	0,3	54,3	58,6	64,0	64,3	68,9	67,8	4,5±0,49 ^a
PML/10%AC	0,1	0,5	67,0	71,3	76,7	77,8	81,3	80,4	3,6±0,07 ^{ae}
PML/5%AE/5%SDS	0,1	0,2	65,7	69,3	73,0	73,0	76,0	74,6	2,7±0,38 ^{cdf}
PML/5%AP/5%SDS	0,1	0,2	71,3	76,2	80,8	81,3	84,2	83,2	1,4±0,04 ^b
PML/5%AC/5%SDS	0,1	0,1	69,2	74,2	78,7	78,8	81,7	80,2	1,4±0,12 ^b
PML/5%AE/10%SDS	0,1	0,3	60,3	66,0	72,8	73,9	77,5	76,3	2,6±0,12 ^{de}
PML/5%AP/10%SDS	0,1	0,5	64,9	70,4	77,1	78,9	82,2	81,5	2,4±0,50 ^{cdg}
PML/5%AC/10%SDS	0,1	0,2	61,5	66,2	71,5	71,6	75,1	73,4	2,1±0,18 ^{bd}
PML/10%AE/20%SDS	0,1	0,4	51,1	57,0	64,6	66,1	71,1	70,1	2,5±0,11 ^{cdg}
PML/10%AP/20%SDS	0,1	0,2	40,6	46,7	54,6	55,9	62,4	61,7	3,5±0,02 ^{ef}
PML/10%AC/20%SDS	0,1	2,4	51,9	57,5	64,4	66,0	71,0	70,4	3,1±0,08 ^{efg}

PML: Proteína miofibrilar liofilizada; AE: Ácido esteárico; AP: Ácido palmítico; AC: Ácido caprótico; SDS: Lauril sulfato de sódio. Letras em comum na mesma linha não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Maior valor de transparência representa menor transparência do filme (ARFAT *et al.* 2014), assim, a escolha da formulação mais adequada dependerá do produto para o qual a embalagem será destinada Figura 10.



Figura 10. Fotografias mostrando a transparência dos filmes: A) filme somente com proteína miofibrilar liofilizada (PML); filmes com PML, SDS e ácidos graxos: B) esteárico; C) palmítico e C) capróico.

5.3.5 Espessura

Na Tabela 5 encontram-se os valores das medidas de espessuras dos filmes elaborados de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante SDS. Os filmes foram elaborados fixando o volume da solução filmogênica dispersa no recipiente de silicone para manter a uniformidade, repetibilidade das medidas de suas propriedades funcionais e assegurar as comparações realizadas entre as propriedades. Com o aumento das concentrações de ácidos e surfactante ocorreu um acréscimo nas espessuras dos mesmos. Este comportamento também foi observado por Oliveira *et al.* (2012), quando aumentou a concentração de ácido graxo e surfactante na solução de gelatina.

A não uniformidade na espessura do filme produzido pode acarretar problemas mecânicos e de conservação, a espessura deve ser fixada de

acordo com a utilização e tipo de alimento a ser embalado (JIMÉNEZ *et al.* 2012). A adição do glicerol nos filmes compostos de proteína, ácidos graxos e SDS proporcionaram filmes com uma rede ordenada, pois segundo Arfat *et al.* (2014) devido a distribuição uniforme do glicerol na rede do filme em pH alcalino, a cadeia estendida facilita o alinhamento molecular.

Uma ampla faixa de valores de espessura para filmes biodegradáveis tem sido reportada na literatura e, de acordo com García *et al.* (2009), a espessura é dependente da composição e dos parâmetros de processamento do filme.

5.3.6 Propriedade de barreira

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes compostos de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante (SDS) produzidos nas diferentes formulações estão apresentados na Tabela 5.

Os filmes contendo apenas ácidos graxos (Tabela 5) em sua composição apresentaram os menores valores para permeabilidade ao vapor de água quando comparados ao filme apenas de proteína (PML), sendo o filme com ácido capróico (10%) de menor cadeia apresentou diferença ($p \leq 0,05$), o que pode ter ocorrido uma melhor interação deste componente hidrofóbico com os biopolímeros presentes na matriz, evitando a ocorrência de espaços pelos quais a água pode permear. Segundo Limpisophon *et al.* (2010) a incorporação de substâncias não-polares ou hidrofóbicas, tais como óleos, gorduras e ácidos graxos, são comumente utilizadas para melhorar a propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes de biopolímeros hidrofílicos. Danvanço *et al.* (2007), quando utilizou apenas os ácidos esteárico e capróico em filmes compostos de gelatina encontrou valores de permeabilidade maiores quando comparado a este estudo.

Oliveira *et al.* (2012), verificaram uma redução na permeabilidade ao vapor de água quando aumentou a concentração dos ácidos graxos no filmes contendo gelatina, não obstante, nas formulações contendo somente o surfactante apresentaram aumento da permeabilidade ao vapor de água.

Era esperado que a porção hidrofóbica do surfactante auxiliasse na redução da difusão das moléculas de água pela estrutura dos filmes emulsionados. Observa-se que os filmes contendo o surfactante SDS nas concentrações de 5% apresentaram maiores valores de PVA com diferença ($p \leq 0,05$) quando comparados ao filme de proteína miofibrilar (PML). Isto pode estar relacionado à solubilização do SDS, possivelmente porque este é um surfactante com a maior parte lipofílica (cauda), pouco solúvel em meio aquoso. Assim, a baixa solubilidade do SDS em água e a natureza lipofílica deste surfactante pode ter provocado uma distribuição não homogênea do surfactante nesta concentração e, conseqüentemente, do componente hidrofóbico. Comportamento verificado por outros autores, que relacionaram a PVA com o aumento da solubilidade do surfactante no meio (CHEN *et al.* 2009; ANDREUCCETTI *et al.* 2011).

Davanço *et al.* 2007, utilizando 70% de surfactante SDS com 10% de ácido esteárico e gelatina verificaram uma menor PVA, indicando aumento da hidrofobicidade, visto que foi utilizado apenas 5% nesta formulação para ambos os componentes, o que pode não ter sido o suficiente para uma distribuição homogênea devido sua baixa dispersão e fraca estabilidade do sistema de emulsão e/ou interação dos componentes hidrofóbicos como o surfactante SDS na matriz protéica. Não obstante os filmes contendo 10% de surfactante SDS não apresentaram diferença significativa em nível de 5% ao comparar ao filme PML.

Segundo Gontard *et al.* (1994), dependendo das características do sistema, o surfactante pode ainda exercer impacto negativo na estrutura dos filmes emulsionados. A presença de grupos hidrofílicos nos surfactantes pode promover a sorção de água na estrutura dos filmes, o que pode facilitar a permeação de água pelo filme. A organização dos lipídeos na matriz polimérica e a interação entre esses componentes são considerados fatores críticos nas propriedades finais de filmes compostos ou emulsionados.

Gontard *et al.* (1994) observaram que as moléculas de substâncias hidrofóbicas que possuem dimensão esférica substancialmente grande, quando utilizadas em formulações de filmes compostos, se esses componentes não forem capazes de se associar com a cadeia de proteína, podem provocar quebra na estrutura da matriz protéica resultando em perda global das propriedades de barreira à água. Porém, se a substância hidrofóbica for capaz de se ligar de maneira adequada à matriz protéica, esta propriedade de barreira se torna resistente.

Tabela 5. Caracterização da permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes

Tipos de Filmes	Espessura (mm)	PVA (g.mm/m ² d.KPa)
PML	0,052±0,004	8,24±0,98 ^{bdf}
PML/5%AE	0,054±0,001	6,95±0,35 ^{bc}
PML/5%AP	0,057±0,001	7,26±0,09 ^{bcf}
PML/5%AC	0,058±0,002	7,48±0,75 ^{bcf}
PML/10%AE	0,059±0,001	7,89±0,29 ^{bcdf}
PML/10%AP	0,054±0,006	6,94±0,76 ^{bc}
PML/10%AC	0,055±0,007	5,89±0,85 ^c
PML/5%AE/5%SDS	0,075±0,008	13,40±0,30 ^a
PML/5%AP/5%SDS	0,063±0,004	11,20±0,86 ^{aeg}
PML/5%AC/5%SDS	0,058±0,002	10,01±0,78 ^{deg}
PML/5%AE/10%SDS	0,057±0,007	7,20±0,57 ^{bch}
PML/5%AP/10%SDS	0,061±0,004	7,41±0,15 ^{bch}
PML/5%AC/10%SDS	0,058±0,001	6,88±0,23 ^{bc}
PML/10%AE/20%SDS	0,079±0,001	11,03±0,23 ^{eg}
PML/10%AP/20%SDS	0,077±0,002	10,57±0,30 ^{ei}
PML/10%AC/20%SDS	0,070±0,001	9,51±0,58 ^{fgih}

PML: Proteína miofibrilar liofilizada; AE: Ácido esteárico; AP: Ácido palmítico; AC: Ácido capríco; SDS: Lauril sulfato de sódio. Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de TUKEY.

Os filmes com as maiores concentrações de ácidos graxos (10%) e surfactante SDS (20%), apresentaram os maiores valores para permeabilidade de água com diferença ($p \leq 0,05$) quando comparados ao filme PML. Isto pode ter ocorrido pela presença de grande quantidade de espuma na solução filmogênica quando eram adicionados os componentes em maiores concentrações, aumentando dessa forma a PVA dos filmes. Deve-se levar em consideração também a inserção de moléculas de grandes volumes, na qual a adição destes componentes possivelmente levou à desestabilização da estrutura (GONTARD *et al.* 1994). Podendo ocorrer à formação de espaços pelos quais a água pode permear pela estrutura com mais facilidade, os mesmos podem se posicionar na estrutura e não se ligar aos demais constituintes, principalmente com as cadeias protéicas.

Segundo Davanço (2006) quando se produzem filmes biodegradáveis emulsionados, atenção especial deve ser dada à etapa de emulsão, em relação à velocidade de agitação, devido à possibilidade de formação de espuma, o que pode levar a formação de estruturas heterogêneas afetando as propriedades mecânicas e de barreira dos biofilmes.

Outro fator que merece destaque em relação à diferença significativa da PVA para os filmes com maiores concentrações de ácidos graxos e surfactante SDS, é a espessura dos filmes, pois a maior concentração dos ácidos graxos e surfactante SDS ocorreram aumento na espessura dos filmes e nos valores de PVA. Esta variação pode ser explicada pelo inchamento da matriz durante a elaboração e secagem dos filmes causando mudanças estruturais e formando rearranjos diferentes para cada formulação, influenciando na espessura dos filmes. Segundo Park e Chinnam (1995) e Bertan (2003) a permeabilidade ao vapor de água pode variar com a espessura dos filmes devido a mudanças estruturais causadas pelo inchamento da matriz filmogênica, que irão afetar a estrutura e provocar tensões internas que influenciam na permeação.

Sobral (2000) estudando a influência da espessura em filmes de proteínas miofibrilares sobre as propriedades funcionais, concluiu que o controle da espessura dos filmes é muito difícil. Nos processos de produção do tipo “casting” ocorrem muitas variações principalmente por dificuldade no controle da relação massa/área no suporte, problemas no controle da umidade relativa do ar de secagem e variações na viscosidade da solução filmogênica.

Fakhouri *et al.* (2003) adicionando diferentes concentrações de triacetina e ácidos graxos variou a espessura dos filmes e os valores de PVA. Segundo Wolf (2007), deve-se levar em consideração a quantidade de massa seca de cada solução filmogênica para controlar a espessura dos filmes.

Davanço *et al.* (2007) verificaram que com adição de surfactante tween 80 (surfactante suave e que não afeta a atividade da proteína) em biofilme de gelatina com glicerol e ácido esteárico não ocorreu diferença da permeabilidade ao vapor de água.

Na Tabela 5 observa-se que os filmes contendo o ácido esteárico de maior cadeia nas concentrações de 10%AE, 5%AE e 5%SDS, 10%AE e 20%SDS apresentaram maiores valores de PVA com diferença ($p \leq 0,05$) quando comparado ao filme de menor cadeia nestas mesmas concentrações (ácido capróico). A polaridade do ácido esteárico pode ter afetado a sua inclusão de forma não homogênea na solução da matriz protéica devido sua cadeia longa (estrutura mais heterogênea). Segundo os autores Morillon *et al.* 2002 e Davanço *et al.* 2007 a polaridade pode afetar a inclusão do ácido na solução, quanto maior o número de carbonos na estrutura lipídica, mais difícil é a incorporação dos compostos lipídicos

na solução protéica. Não obstante, este filme apresentou os maiores valores de espessura nessas concentrações.

Segundo alguns autores, a permeação de água em filmes compostos depende de vários outros fatores, a estrutura química dos componentes lipídicos adicionados (rearranjo e tamanho das cadeias de ácidos graxos), o grau de organização destes componentes, o espaço livre por qual a molécula de água pode permear (BRAVIN *et al.* 2004; BERTAN *et al.* 2005b) e a natureza do surfactante utilizado (ANDREUCETTI *et al.* 2011; PENG *et al.* 2013).

5.3.7 Solubilidade em água

Na Tabela 6 encontram-se os valores de solubilidade obtido para os filmes compostos produzidos com proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante (SDS). A solubilidade dos filmes em água está diretamente relacionada aos seus componentes, ou seja, com a hidrofobicidade/hidrofobicidade e estrutura.

Em relação aos filmes com adição somente dos ácidos graxos, observou-se que o aumento da adição da concentração hidrofóbica de 5% para 10% (ácidos esteárico, palmítico e capróico) causou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da solubilidade dos filmes em água nas faixas das concentrações estudadas quando comparados aos filmes nas menores concentrações destes e ao filme PML, isto pode estar relacionado ao aumento da concentração do componente hidrofóbico reduzindo as interações protéicas e dificultando a interação proteína-lipídeo. Esta dificuldade de interações entre o lipídeo-proteína confere ao filme uma estrutura frágil e heterogênea, propiciando maior solubilidade em relação aos filmes.

Segundo os autores Zahedi *et al.* (2010) e Bahram *et al.* (2014) a incorporação do componente lipídico pode reduzir a solubilidade dos filmes em água devido a sua natureza hidrofóbica. Entretanto, a presença dos componentes lipídicos pode ter reduzido as interações moleculares entre as cadeias protéicas (diminuição das forças intermoleculares entre as cadeias de proteína) provavelmente a partir desta quantidade (5% ácido graxo), pois a adição de ácidos graxos acima de determinada concentração pode levar a desestabilização da estrutura, aumentando assim a solubilização dos

componentes em água (GONTARD *et al.* 1994; BERTAN *et al.* 2005). Filmes biodegradáveis com alta solubilidade podem ser utilizados para armazenar porções individuais de alimentos que serão dissolvidos em água quente ou durante o seu preparo (GONTARD *et al.* 1992).

Este mesmo comportamento foi observado por Bertan (2003) e Bertan *et al.* (2005) quando utilizaram ácido esteárico, palmítico, láurico e breu branco e somente ácidos graxos, respectivamente em filmes compostos de gelatina.

Fakhouri *et al.* (2009) quando estudou ácidos graxos de cadeia longa e curta (palmítico, mirístico, caprótico e cáprico) observou que não houve diferença significativa na solubilidade em água dos filmes a base de gelatina quando variou suas concentrações. Não obstante, para o ácido caprótico o valor de solubilidade foi maior do que o encontrado neste trabalho.

Tabela 6. Solubilidade dos filmes composto de proteína, glicerol, ácido esteárico, palmítico e caprótico e surfactante (SDS)

Tipos de Filmes	Solubilidade (%)
PML	38,44±2,40 ^b
PML/5%AE	92,48±0,28 ^c
PML/5%AP	65,33±0,66 ^d
PML/5%AC	59,76±0,06 ^e
PML/10%AE	100,00±0,00 ^a
PML/10%AP	100,00±0,00 ^a
PML/10%AC	100,00±0,00 ^a
PML/5%AE/5%SDS	34,14±2,13 ^b
PML/5%AP/5%SDS	37,40±1,98 ^b
PML/5%AC/5%SDS	37,87±1,68 ^b
PML/5%AE/10%SDS	47,10±0,05 ^f
PML/5%AP/10%SDS	36,92±0,97 ^b
PML/5%AC/10%SDS	50,42±0,91 ^f
PML/10%AE/20%SDS	100,00±0,00 ^a
PML/10%AP/20%SDS	100,00±0,00 ^a
PML/10%AC/20%SDS	100,00±0,00 ^a

PML: Proteína miofibrilar liofilizada; AE: Ácido esteárico; AP: Ácido palmítico; AC: Ácido caprótico; SDS: Lauril sulfato de sódio. Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

Os filmes contendo 5% ácidos graxos com o surfactante SDS, não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados ao filme de proteína miofibrilar (PML), exceto os filmes com os ácidos esteárico e caprótico

com a maior concentração do surfactante. De acordo com Rocha (1999), a parte apolar do surfactante tem baixa solubilidade em água devido ao efeito hidrofóbico, provocada principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água.

Nos filmes com o surfactante SDS verificou-se que o aumento da quantidade deste surfactante (5, 10 e 20%), provoca aumento da solubilidade dos filmes em água de forma significativa ($p \leq 0,05$) comparado aos filmes com SDS e ao filme PML, exceto para o filme com ácido palmítico, isso pode estar relacionado com a formação de micela do surfactante SDS, onde esta formação acima de uma determinada concentração micelar crítica (CMC) diminui a tensão superficial do surfactante na solução protéica. A presença de grande quantidade de micelas com a parte hidrofílica voltada para a superfície do filme terão mais afinidade de ligação (ou interações) com as moléculas de H₂O presentes no filme e no meio, aumentando a solubilidade dos mesmos.

Segundo De Gusmão et al. (2010) e Rufino et al. (2011) a tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna.

De acordo com Hiemenz (1986), acima da CMC o número de micelas tende a aumentar e também o tamanho e a forma individual das mesmas. Há uma mudança abrupta nas propriedades físico-químicas da solução de surfactante quando a CMC é excedida incluindo a tensão superficial, condutividade elétrica, turbidez e pressão osmótica. Minatti (2005) afirma que forças eletrostáticas concentram compostos hidrofílicos junto à superfície de micelas enquanto compostos lipofílicos podem ser solubilizados em seu interior.

Outro fator que merece destaque pode estar relacionado à desnaturação das proteínas provocada pelo SDS aumentando a solubilidade. Estes resultados mostram que a adição de surfactante aumentou a solubilidade em água dos filmes compostos provavelmente devido ao enfraquecimento das forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas, desestabilizando assim sua estrutura. Segundo Giacomelli (2005) a presença deste na solução formadora do filme, tem um duplo efeito, pois além de promover a solubilização

do plastificante, contribui para a desnaturação da proteína aumentando também a solubilidade e estabilidade da mesma no meio.

Davanço (2006) observou que a solubilidade em água dos filmes de gelatina, triacetina, ácido esteárico e surfactantes, aumentou com a adição dos surfactantes. Nos filmes com o surfactante SDS verificou-se que o aumento da quantidade deste surfactante, provoca aumento da solubilidade dos filmes e atribuiu isto a propriedade desnaturante que o SDS apresenta. Encontrou valores maiores de solubilidade para o ácido esteárico de maior cadeia com diferença significativa ($p \leq 0,05$) comparado ao ácido capróico de menor cadeia.

A adição dos surfactantes nos filmes emulsionados deveria agir promovendo melhor incorporação dos compostos hidrofóbicos na matriz protéica, modificando a estrutura dos filmes que esta relacionada diretamente com a solubilidade destes filmes em água e com a possibilidade de que as micelas de surfactante poderiam provocar maior afinidade lipídio-proteína. (Ferreira, 2006).

5.3.8 Propriedades mecânicas

Os resultados de tensão na ruptura (RT) e alongação (E%) dos filmes compostos de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e surfactante SDS produzidos nas diferentes formulações testadas são apresentados na Tabela 7.

Em relação aos filmes contendo em sua formulação somente os ácidos graxos, a adição do ácido palmítico e capróico (5%), e ácido esteárico 10% provocou um aumento da resistência mecânica comparados aos filmes contendo apenas proteína (PML) com um aumento de 29, 13,33 e 10,5% respectivamente. Não obstante, a adição dos ácidos graxos (palmítico e capróico) em maiores concentrações (10%) enfraqueceram os filmes de proteína de forma significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados aos de menores concentrações (5%) e ao filme PML, apresentando assim menores resistências à tração.

Esses resultados confirmaram que a fase protéica apresenta maior resistência à tração que a fase lipídica, e que o aumento da concentração da fase lipídica provocou a redução da resistência à tração da fase protéica.

Segundo Callegarin (1997) as propriedades mecânicas dos filmes dependem das interações entre os componentes, ou seja, da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias. Para manter a integridade e a propriedade de barreira, filmes devem ser hábeis em resistir às tensões normais encontradas durante sua aplicação.

A redução na RT era esperada com o aumento da adição de componentes hidrofóbicos na matriz, uma vez que os lipídeos podem interferir nas interações do tipo proteína-proteína ou levar a segregação da fase lipídica (TAPIA-BLÁCIDO *et al.* 2007). Segundo Yang e Paulson (2000) tal resultado teria ocorrido pela substituição parcial dos polímeros pelos lipídios na matriz filmogênica, onde a interação lipídio-lipídio (moléculas apolares) e lipídios e as moléculas dos polímeros apresentam menor energia que a ligação proteína-proteína influenciando, portanto, nas propriedades mecânicas. Uma diminuição da RT pode ser atribuída quando se adiciona componentes de caráter hidrofóbico na matriz por meio de uma emulsão, podendo proporcionar o desenvolvimento de descontinuidade na rede dos polímeros, como pontos de quebra (BRAVIN *et al.* 2004).

O decréscimo na RT devido a adição de lipídeos na matriz foi observado por Atarés *et al.* (2010) e Valenzuela *et al.* (2013). Bertan (2003), quando adicionou somente ácidos graxos (esteárico, palmítico e blenda esteárico-palmítico), observou uma diminuição significativa nos valores de resistência à tração comparado ao filme elaborado somente com gelatina. Davanço *et al.* (2007) encontrou valor menor para RT para filme composto de gelatina contendo ácido esteárico comparado ao filme com ácido caprótico.

Todas as formulações contendo ácidos graxos e surfactante SDS apresentaram valores de alongação (%E) maiores quando comparados ao filme contendo apenas proteína miofibrilar (PML) com diferença significativa ($p \leq 0,05$), aumentando a flexibilidade dos filmes, exceto o filme com 5% de ácidos graxos. Acredita-se que os componentes de caráter hidrofóbico tenham atuado como plastificante ou lubrificante na matriz, diminuindo a força intermolecular entre as cadeias de proteínas adjacentes e aumentando a flexibilidade dos filmes (CALLEGARIN *et al.* 1997). As mudanças nesta propriedade caracterizam modificações na organização tridimensional, decrescendo a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares

ocorridas na rede protéica formadora do filme e aumentando o volume vazio e a mobilidade da cadeia (GALLIETTA *et al.* 1998).

Tabela 7. Resistência a tração (RT) e percentual de alongação (%E) dos filmes composto de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capríco) e surfactante SDS.

Tipos de Filmes	RT (MPa)	E(%)
PML	2,10±0,12 ^{bc}	49,05±3,20 ^b
PML/5%AE	1,52±0,20 ^{bgh}	72,00±6,20 ^{bde}
PML/5%AP	2,71±0,22 ^{ace}	69,15±6,74 ^{bd}
PML/5%AC	2,38±0,20 ^{cde}	58,80±5,98 ^b
PML/10%AE	2,32±0,16 ^{cde}	191,40±12,55 ^a
PML/10%AP	1,40±0,07 ^{gh}	120,15±8,04 ^{il}
PML/10%AC	1,17±0,20 ^h	129,35±10,30 ^{il}
PML/5%AE/5%SDS	2,04±0,16 ^{bdfg}	116,75±9,91 ^{cfi}
PML/5%AP/5%SDS	1,85±0,40 ^{bdg}	86,75±7,69 ^{dg}
PML/5%AC/5%SDS	1,79±0,31 ^{bdgh}	93,95±8,70 ^{efg}
PML/5%AE/10%SDS	3,09±0,47 ^a	179,50±12,41 ^{ah}
PML/5%AP/10%SDS	2,37±0,37 ^{cde}	163,95±10,97 ^{hj}
PML/5%AC/10%SDS	1,78±0,05 ^{bdgh}	133,04±9,86 ^{ij}
PML/10%AE/20%SDS	2,11±0,13 ^{bcd}	172,60±8,99 ^{ah}
PML/10%AP/20%SDS	2,82±0,45 ^{ae}	134,95±8,24 ^{il}
PML/10%AC/20%SDS	2,56±0,19 ^{acf}	142,60±8,15 ^{jl}

PML: Proteína miofibrilar liofilizada; AE: Ácido esteárico; AP: Ácido palmítico; AC: Ácido capríco; SDS: Lauril sulfato de sódio. Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa a $p \leq 0,05$, entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

A capacidade de alongar um filme corresponde à máxima variação no comprimento da amostra antes da quebra ou ruptura, ou seja, mede o percentual de alongação (%E). Nos filmes elaborados somente com ácidos graxos, o aumento da concentração das substâncias hidrofóbicas (10%) proporcionou os maiores valores de alongação de forma significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados aos filmes com menores concentrações dessas substâncias (5%). Este efeito pode estar relacionado ao efeito plastificante dos lipídeos, pois alguns lipídios (acetoglicerídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolipídios) são usados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos (CALLEGARIN *et al.* 1997).

O mesmo comportamento foi observado por Bertan (2003), quando adicionou ácidos esteárico e palmítico e blenda (mistura dos ácidos) em filmes

compostos de gelatina. Péroval *et al.* (2002) observaram uma diminuição da alongação ao incorporar ácidos graxos aos filmes de arabinosilana e argumentaram que alguns lipídios são incapazes de formar uma matriz coesa e contínua, causando desta forma menor alongação.

Em relação aos filmes contendo o surfactante SDS, os filmes contendo ácidos esteárico e palmítico na concentração de 10% do SDS e os filmes ácidos palmítico e capríco contendo 20% do mesmo obtiveram os maiores valores de resistência a tração comparado ao filme apenas de proteína (PML), porém apresentando diferença significativa em nível de 5% o ácido esteárico (10% SDS) e ácido palmítico (20% SDS). Conforme aumentou-se a concentração do surfactante SDS (5, 10 e 20%) nas formulações contendo os três tipos de ácidos graxos, foi observado um aumento de forma significativa ($p \leq 0,05$) nos valores de RT para os ácidos palmítico e capríco, exceto para o esteárico. Isso possivelmente pode ter ocorrido devido à maior solubilidade e homogeneidade da incorporação dos compostos hidrofóbicos e interação dos mesmos na matriz polimérica com o aumento da concentração do surfactante produzindo melhor estruturação.

Na presente pesquisa, observou-se que com o aumento da concentração do SDS (em algumas combinações) ocorreu formação de estruturas mais fortes, favorecendo interações hidrofóbicas SDS-lipídeos. A presença do surfactante melhorou a incorporação lipídica na matriz protéica, fazendo com que ocorresse uma homogeneização das gotas de lipídeos na solução filmogênica estando diretamente relacionada à tensão na ruptura, obtendo melhores valores de resistência mecânica.

Segundo Rhim *et al.* (2002), a redução na resistência mecânica nos filmes com SDS parece estar relacionada com a formação de estruturas mais fracas devido à falta de interações hidrofóbicas nas proximidades das cadeias moleculares de proteína, favorecendo interações hidrofílicas SDS-proteína. Davanço *et al.* (2007) observou uma redução significativa na resistência a tração quando o surfactante SDS foi adicionado em filmes composto de gelatina contendo ácidos esteárico e capríco.

Houve um aumento com diferença ($p \leq 0,05$) no percentual de alongação (%E) quando a concentração do surfactante SDS passou de 5% para 10% nos filmes contendo os ácidos graxos, não obstante este efeito não ocorreu quando

aumentou para 20%. A concentração de surfactante com aumento da concentração dos ácidos graxos (10%) proporcionaram um efeito negativo na elongação dos filmes. Davanço *et al.* (2007) observaram uma redução significativa na elongação dos filmes quando o surfactante SDS foi adicionado em determinadas concentrações em filmes composto de gelatina contendo ácidos esteárico e capríco.

Segundo Yoshida (2002), o tamanho, o número de carbonos na cadeia e o número de grupos hidroxila funcionais nas moléculas de plastificante influenciam as propriedades mecânicas, favorecendo a ligação com moléculas de água, que atuam como plastificante na matriz filmogênica, aumentando a porcentagem de elongação.

5.3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura dos filmes (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura de um filme busca correlacionar às propriedades físico-químicas com sua estrutura morfológica (MAUER *et al.* 2000). Pode ser utilizada para avaliar a homogeneidade da superfície dos filmes, sua estrutura, presença de partículas, poros e rachaduras.

As micrografias da superfície dos filmes compostos de proteína, ácidos graxos (esteárico, palmítico e capríco) e surfactante SDS estão representados nas Figuras 11, 12, 13 e 14. No filme com proteína miofibrilar liofilizada (PML) (Figura 11), observa-se uma estrutura homogênea, onde segundo Limpan *et al.* (2010) proteínas miofibrilares agregam-se para formar uma rede densa e contínua. Porém, pode ser observada a presença de pequenas bolhas de ar, que podem ter surgido devido à etapa de homogeneização da solução, onde ocorreu a formação de espuma. Não obstante, isto não afetou a propriedade de barreira do filme, mas, a propriedade mecânica (%E) foi afetada pela presença de rachaduras (fissuras) na superfície do mesmo, provavelmente devido ao processo de secagem não adequado, obtendo filmes mais frágeis.

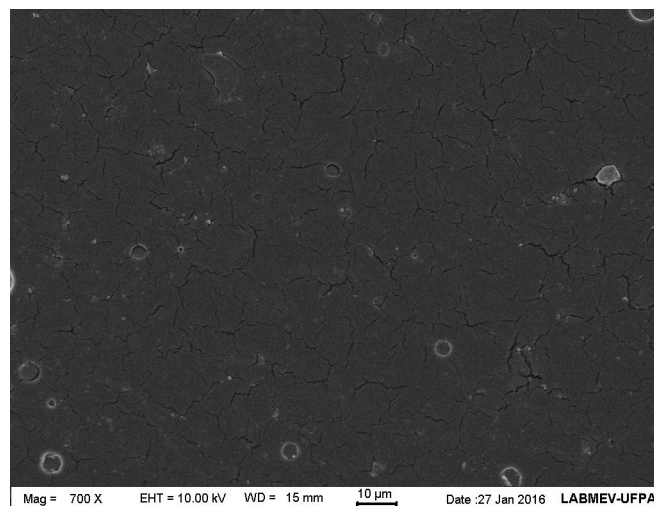


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura do filme apenas com proteína miofibrilar liofilizada (PML).

Para os filmes com adição somente dos ácidos graxos foi observado que apresentaram estruturas sem a presença das gotículas desses materiais nas matrizes filmogênicas quando utilizados em menores concentrações (5%) indicando a incorporação homogênea destes à matriz protéica (Figura 12A, C e E), o filme com ácido esteárico de maior cadeia apresentou em sua superfície estrutura mais homogênea, conferindo desta maneira melhor propriedade de barreira (Tabela 5). O filme com ácido capróico (Figura 12E) apresentou fissuras em sua superfície, proporcionando filme menos flexível (%E) (Tabela 7) e com maior permeação de água (PVA) na estrutura (Tabela 5).

O aumento da concentração dos ácidos graxos (10%) para estas mesmas formulações (Figuras 12B, D e F) indicou mudança morfológica na superfície dos filmes com a presença de glóbulos de emulsão, devido não ter ocorrido incorporação dos ácidos graxos nas matrizes protéicas, causando irregularidades nas mesmas. O filme com o ácido esteárico (Figura 12B) que apresentou maior irregularidade, afetando a propriedade de barreira, e valor mais elevado da permeabilidade ao vapor de água (Tabela 5). Pode ser atribuída à incorporação de componentes hidrofóbicos em altas proporções a modificação na estrutura dos filmes compostos (BINSI *et al.* 2013). Estas modificações foram também reportadas por Wong *et al.* (1992), ao adicionar ácidos graxos em soluções filmogênicas de quitosana e Davanço *et al.* (2007), quando utilizou os ácidos esteárico e capróico em filmes compostos de gelatina.

Após a adição do surfactante SDS nos filmes com os ácidos graxos (Figura 13), as matrizes poliméricas apresentam-se sem gotas de gordura, indicando que o surfactante foi eficiente na incorporação dos ácidos graxos nas matrizes filmogênicas quando comparadas com as formulações com maior concentração de ácidos graxos (10%) sem a adição deste tensoativo (Figura 12B, D e F). No entanto, nos filmes com 5% de SDS foi observada a presença mais acentuada de partículas na superfície, devido às partículas de surfactante não solubilizadas, afetando a permeabilidade ao vapor de água (Tabela 5). A modificação na estrutura dos filmes compostos pode ser atribuída à falta de miscibilidade dos componentes (FABRA *et al.* 2009).

Segundo Tongnuanchan *et al.* (2014) diferentes surfactantes incorporados contribuíram para estrutura ou morfologia dos filmes (distribuição de gotículas de óleo) e propriedades de forma diferente.

O filme com o ácido capróico e o surfactante SDS (ambos com 5%) (Figura 13E) apresentou maior irregularidade na superfície, com a presença de pequenas gotas de emulsão. Um mecanismo sugerido é que a emulsão formada no filme com SDS não tenha sido estável suficiente para evitar o colapso das gotículas do ácido quando estes filmes foram expostos à elevada umidade relativa, como, por exemplo, na análise de permeabilidade ao vapor de água, no entanto, este comportamento não afetou de forma significativa a propriedade de barreira comparado aos ácidos na mesma concentração (Tabela 5). A evaporação do solvente durante a secagem da solução formadora do filme pode induzir modificações na estrutura da emulsão, devido a fenômenos de desestabilização, como floculação, coalescência e separação da fase lipídica (FABRA *et al.* 2009).

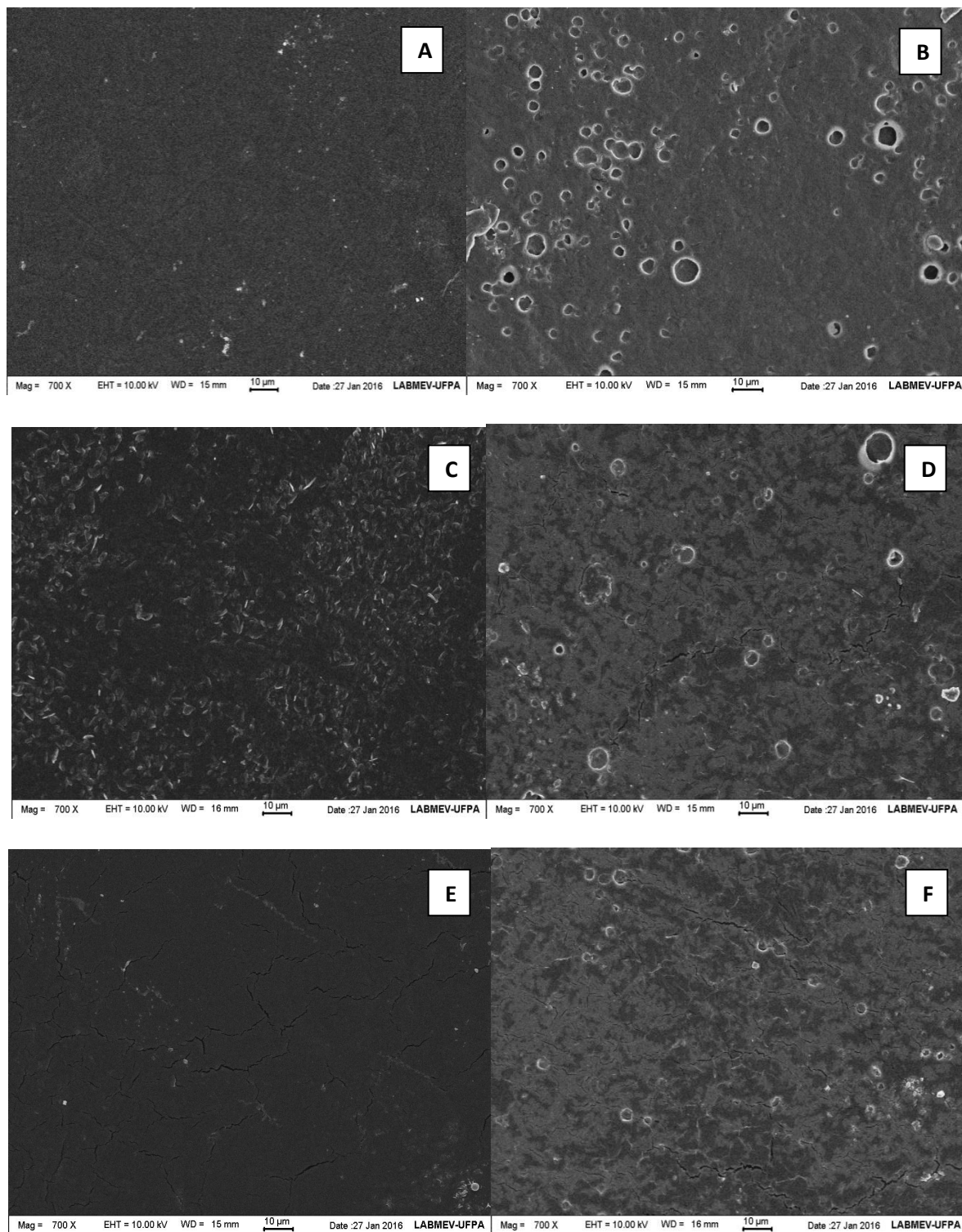


Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo proteína miofibrilar liofilizada (PML): A) PML e 5% ácido esteárico e B) PML e 10% ácido esteárico; C) PML e 5% ácido palmítico e D) PML e 10% ácido palmítico; E) PML e 5% ácido capríco e F) PML e 10% ácido capríco.

Observa-se de forma clara que o filme contendo o ácido esteárico (5%) de maior cadeia com a maior concentração do surfactante SDS (10%) (Figura

13B) apresentou a superfície mais homogênea, conferindo melhores propriedades mecânicas para este filme (Tabela 7). Não obstante, o filme com ácido capróico (5%) em maior concentração do SDS (10%) (Figura 13F) foi o que apresentou melhor propriedade de barreira comparado aos filmes nas mesmas concentrações (Tabela 5), com presença de partículas na superfície do filme, proporcionando maior solubilidade (Tabela 6). A propriedade mecânica (Tabela 7) foi afetada devido à maior irregularidade apresentada pela superfície deste filme comparado aos filmes com os ácidos e SDS na mesma concentração.

Todos os filmes onde se utilizou a menor concentração dos ácidos graxos (Figura 13) com maior concentração de SDS (Figura 13B, D e F) comparado aos filmes em menor concentração deste tensoativo (13A, C e E) foram os que apresentaram melhor propriedade de barreira (Tabelas 6).

Os filmes com as maiores concentrações dos ácidos graxos (10%) e do surfactante SDS (20%) (Figura 14) apresentaram uma mudança na morfologia, proporcionando filmes esbranquiçados. O filme com o ácido palmítico (Figura 14B) apresentou estrutura mais heterogênea, mas as propriedades de barreira e mecânica não foram afetadas, e apresentou a menor permeabilidade (Tabela 5) e maior resistência à tração (Tabela 7) comparado aos filmes com as mesmas concentrações (Figura 13A e C). Davanço *et al.* (2007), quando utilizaram o ácido esteárico e o surfactante SDS em filmes composto de gelatina observaram filmes com coloração esbranquiçadas.

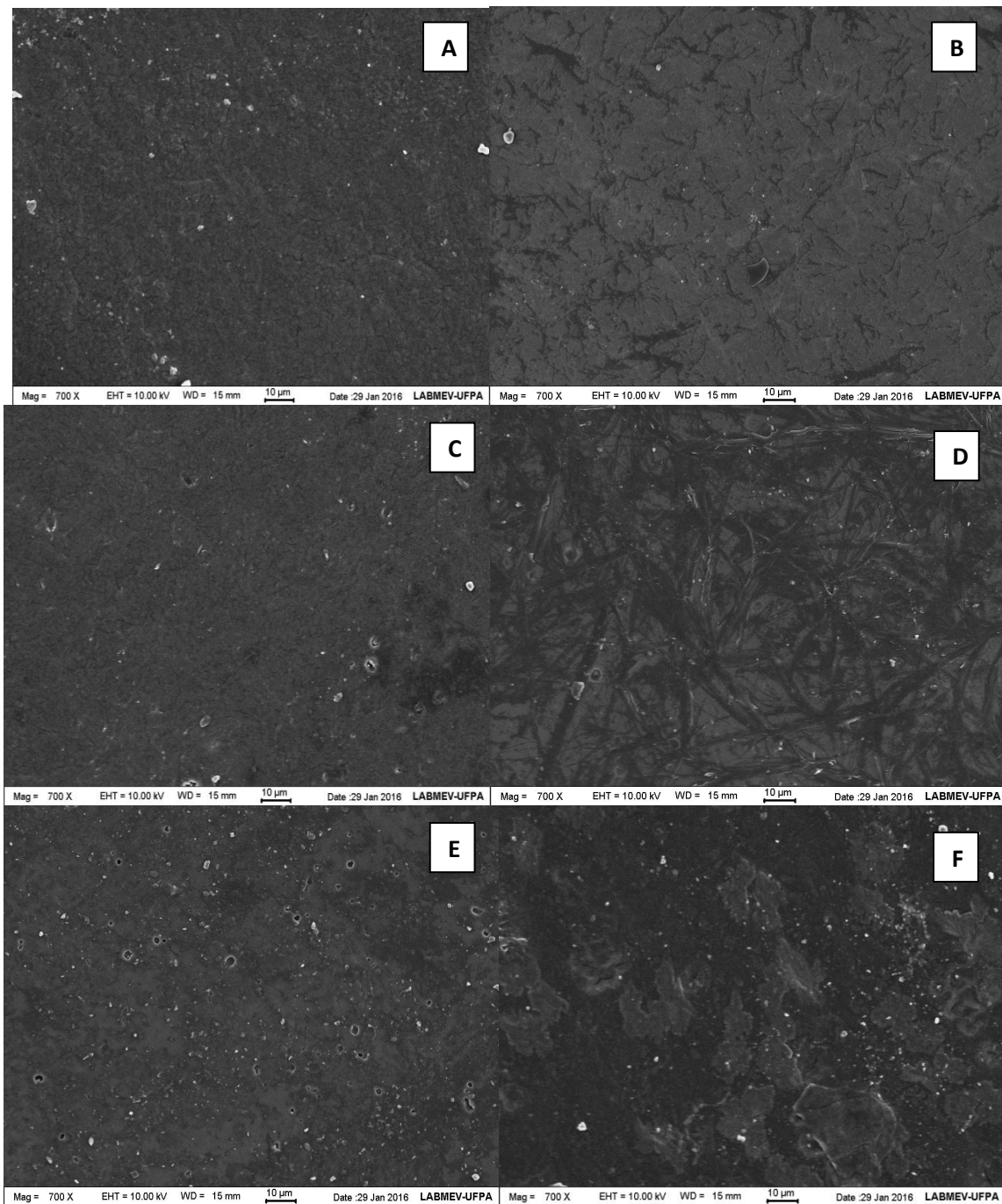


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo Proteína Mifibrilar Liofilizada (PML) e Lauril Sulfato de Sódio (SDS): A) PML, 5% ácido esteárico e 5% SDS e B) PML e 5% ácido esteárico e 10% SDS; C) PML, 5% ácido palmítico e 5% SDS e D) PML, 5% ácido palmítico e 10% SDS; E) PML, 5% ácido capríco e 5% SDS e F) PML, 5% ácido capríco e 10% SDS.

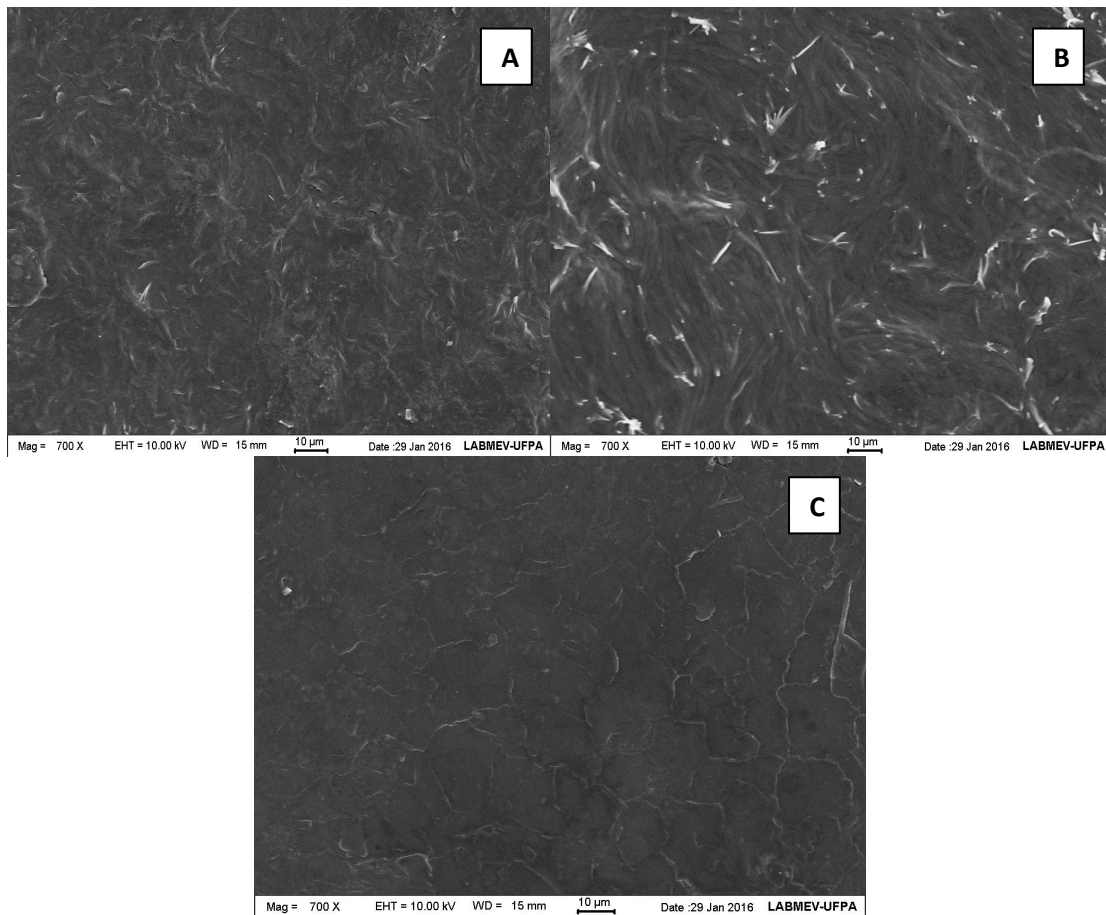


Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes contendo Proteína Mifibrilar Liofilizada (PML) e Lauril Sulfato de Sódio (SDS): A) PML, 10% ácido esteárico e 20% SDS e B) PML, 10% ácido palmítico e 20% SDS; C) PML, 10% ácido capróico e 20% SDS.

6 CONCLUSÃO

Os filmes apresentaram baixa solubilidade em meio aquoso, quando o SDS foi adicionado nas menores concentrações. A permeabilidade ao vapor de água foi fortemente influenciada pelos ácidos graxos empregados e pela espessura dos filmes. A adição combinada de 5% dos ácidos e 10% de SDS também levaram à redução do valor da PVA comparado ao filme PML. Os ácidos e o SDS promoveram a flexibilidade dos filmes, proporcionando filmes com maior %E comparados ao filme apenas de proteína (PML).

Os filmes compostos somente com ácidos graxos apresentaram glóbulos de emulsão dispersos com o aumento da hidrofobicidade na matriz. A incorporação do surfactante SDS modificou a estrutura superficial e interna dos filmes e a adição de maior concentração de SDS proporcionou filmes esbranquiçados.

Os filmes compostos com os três ácidos graxos (esteárico, palmítico e capróico) e o SDS, mostraram-se apropriados para os sistemas avaliados, entretanto, a formulação mais apropriada deve ser ajustada de acordo com as características dos alimentos e tipo de utilização.

As metodologias desenvolvidas neste trabalho permitiram a caracterização quanto à funcionalidade de filmes compostos de proteína miofibrilar liofilizada, e conhecer seu potencial como embalagem para alimentos.

7 REFERÊNCIAS

- ABABOUCHE L. Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. Topics Fact Sheets. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**. Rome: FAO; 2005.
- ACTON, J. C.; ZIEGLER, G. R.; BURGE JR., D. L. E FRONING, G. W. Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products Critical. **Reviews in Food Science & Nutrition**, 18 (2), pp. 99–121. 1982.
- AHMAD, M.; BENJAKULA, S.; PRODPRANB, T.; AGUSTINIC, T. W. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Technology**. v. 28, p. 189-199, 2012.
- ANDREUCETTI, C.; CARVALHO, A. R.; GARCÍA, T. G.; BUSTOS, F. M.; GROSSO, C. R. F. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 129-136, 2011.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **D882-91: Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Philadelphia: ASTM, 1996. (Annual Book of ASTM Standards).
- ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 989-995, 2001.
- ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S. PRODPRAN, T., OSAKO, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**. v. 39, p. 58-67, 2014.
- ARNESEN, J. A.; GILDBERG, A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmosalar*) skin. **Bioresource technology**, v. 98, n. 1, p. 53–7, jan. 2007.
- ARTHARN, A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; TANAKA, M. Properties of a protein-based film from round scad (*Decapterusmaruads*) as affected by muscle types and washing. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 3, p. 867-874, 2007.
- ARRUDA, L. F. BORGHESI, R.; BRUM, A.; REGITANO D'ARCE, M.; OETTERER, M. Nutritional aspects of nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) silage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.749-756, 2006.
- ATARÉS, L.; DE JESÚS, C.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 3, p. 384-399, 2010b.
- ATKINS, P. W. **Físico-química**, cap. 13. Macromoléculas e colóides, 6ªed.p.319-348, 1997.

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. HORWITZ, W, 17^a ed. Arlington: AOAC Inc., v.1 e v.2., 2000.

BATISTA J. A. Desenvolvimento, Caracterização e Aplicações de Biofilmes a Base de Pectina, Gelatina e Ácidos Graxos em Bananas e Sementes de Brócolos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

BALDWIN, A. NISPEROS, O.; HAGENMAIER, D.; BAKER, R. A Use of lipids in coatings for food products. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.6, p.56-62, 1997.

BAHRAM, S.; REZAEI, M.; SOLTANI, M.; KAMALI, A.; OJAGH, S. M.; ABDOLLAHI, M. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1251-1258, 2014.

BELL, A E Gel structure and food biopolymer. In: HARDMAN T. M. (ed): **Water and Food Quality**. London: Elsevier Applied Science, p. 251-275, 1989.

BENJAKUL, S. et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthustayenus* and *Priacanthusmacracanthus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 1, p. 132– 8, 15 jan. 2010.

BENJAKUL S.; , ARTHARN A.; PRODPRAN T. Properties of protein-based film from round scad (*Decapterusmaruadsi*) muscle as influenced by fish quality. **Food Science and Technology**. v. 41, p. 753-763, 2008.

BERTAN, L.; C. **Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Simples e Compostos a base de Gelatina, Ácidos Graxos e Breu Branco**. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. (obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição). Campinas-2003.

BERTAN, L. C.; FAKHOURI, F. M.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Influence of the addition of lauric acid to films made from gelatin, triacetin and a blend of stearic and palmitic acids. **Macromolecular Symposia**, v. 229, n. 1, p. 143–149, 2005.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 73-82, 2005.

BINSI, P. K. et al. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthushamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 132–145, jan. 2009.

BINSI, P. K.; RAVISHANKAR, C. N.; GOPAL, S. Development and characterization of and edible composite film based on chitosan and virgin coconut oil with improved moisture sorption properties. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. E526-E534, 2013.

BLANCO-PASCUAL, N.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. **LWT - Food Science and Technology**. v. 55 p. 543-550, 2014.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.

BORAN, G.; REGENSTEIN, J. M. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 8, p. E432–41, out. 2009.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M.S. Improvement of water barrier property of rice starch-chitosan composite film incorporated with lipids. **Food Sci. Technol. Int.** v.15, p. 149–158, **2009**.

BRAVIN, B.; PERESSINI, D.; SENSIDONI, A. Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. v. 52, p. 6448–6455, 2004.

CABA, K., PENA, C., CIANNAMEA, E. M., STEFANI, P. M., MONDRAGON, I., RUSECKAITE, R. A. Characterization of soybean protein concentrate-stearic acid/palmitic acid blend edible films. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 124, n. 3, 1796-1807, 2012.

CALLEGARIN, F. et al. Lipids and Biopackaging. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 74, n. 10, p. 1183-1192, 1997.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SOUZA, M. P. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 3, p. 379-385, 2009.

CAROLINE A.; ROSEMARY A.C.; CARLOS R.F.G. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant. **Food Research International**. v. 43, p. 1710-1718, 2010.

CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; THOMAZINE, M.; HABITANTE, A. M. Q. B.; GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., et al. Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.1117-1123, 2008.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effects of interactions between the constituents of chitosan-edible films on their physical properties. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 8, p. 3181-3192, 2012.

CHEN, C. H., KUO, W. S., LAI, L. S. Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 714-721, 2009.

CHINABHARK, K.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of pH on the properties of protein-based film from bigeye snapper (*Priacanthustayenus*) surimi. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 221- 225, 2007.

CORTEZ-VEJA, et al. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: Avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. **Brazilian Journal of Food technology**. Campinas, v. 16, n. 2, p. 90-98, 2013.

DAMIÁN, M. et al. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**. v.10, p.1-5, 2005.

DAMODARAN, S. Food proteins: An overview. In: **Food proteins and their applications**. (Eds) Damodaran, S.; Paraf, A., Marcel Dekker Inc., New York, 1-21. 1997.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and function of protein-based edible films and coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; KERRY C.; HUBER, K. C. (Eds.). **Edible Films and Coatings for Food Applications**. New York: Springer, p. 25-26, 2009.

DAVANÇO, T; TANADA-PALMU, P; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capróico: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 408-416, Campinas. 2007.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e Caracterização de Biofilmes à base de Gelatina, Triacetina, Ácido esteárico ou Ácido capróico e Surfactantes**. Dissertação (título de Mestre em Alimentos e Nutrição apresentada). Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas. Campinas – 2006.

DE GUSMAO C. A. B.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP 1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World J. Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 1683 – 1692, 2010.

FABRA, M.J.; JIMÉNEZ, A.; ATARÉS, L.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. **Biomacromolecules** v. 10, p. 1500–1507, 2009.

FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 676-683, 2009.

FAKHOURI, F. M.; FONTESA, L. C. B.; INNOCENTINI-MEIB, L. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Effect of fatty acid addition on the properties of biopolymer films based on lipophilic maize starch and gelatin. **Food Technology**, v. 61, p. 528-536, 2009.

FAKHOURI F. M .; BATISTA J. A. ; GROSSO C.R.F. Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Comestíveis de Gelatina, Triacetina e Ácidos Graxos, **Brazilian Journal of Food Technology**, vol6, n2, 301-308, jul/dez 2003.

FERREIRA, A. H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – 2006.

FELTES. M. M. C; CORREIA, J. F. G; BEIRÃO, L. H; BLOCK, J; NINOW, J; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.6, p.669-677, Campina Grande, PB. 2010.

FIGUEIRÊDO, P. N. V.; MORAI, S. M.; MARTINS, J. A. M.; CAVALCANTE, L. B.; DIAS, P. M. D.; COSTA, I. R. S.; MACHADO, L. K. A. Levels of total lipids and cholesterol in five species of fish caught in the region of Oiapoque-Amapá. **Ciência Animal** 20(1):35-42, 2010.

FOEGEDING, E. A., LUCK, P. J. AND DAVIS, J. P. Factors determining the physical properties of protein foams. **Food Hydrocolloids**, 20:284–92. 2006.

GARCÍA, F. T.; SOBRAL, P. J. A. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 38, n. 3, p. 289-296, 2005.

GARCÍA, M. A.; PONOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of starch and composite edible films and coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (Eds.). **Edible films coatings for food applications**. New York: Springer. p. 169-210, 2009.

GALLO, J-A Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F. e VOILLEY, A Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **Journal of Membrane Science.**, Amsterdam, v.180, p.37-46, 2000.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; HANNA, M.A.; FRONING, G.W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v.61, p.585-589, 1996.

GHEBREMESKEL, A. N., VEMAVARAPU, C., LODAYA, M. Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: selection of polymere surfactant combinations using solubility parameters and testing the processability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 119 e 129, 2007.

GIACOMELLI, V. S. **Morfologia, Propriedades Térmicas e Mecânicas de Filmes de Proteína Isolada de Soja / Dodecil Sulfato de Sódio / Policaprolactona-triol**. Pós Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina (requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química). Florianópolis, 2005.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GOSSIS, L. G. M. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films amd coatings. **Food Science & Techonology – Lebensmittel Wissenschaft & Technologie** 29(1,2): 10-17, 1997.

GONTARD, N.; Guilbert, S.; Cuq, J.-L. Edible wheat gluten films: Influence of main process variables on film properties using response surface methodology. **J. Food Sci.**, v.57, p. 190–195, 1992.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal Food Science Technology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994.

GUERRERO, P.; NUR HANANI, Z. A.; KERRY, J. P.; DE LA CABA, K. Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. **Journal of Food Engineering**, v. 107, n. 1, p. 41-49, 2011.

HAN, J. H. e FLOROS, J. D. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. **Journal of Plastic Film and Asheeting**, 13, 287-298, 2010.

HAMAGUCHI, P. Y.; WUYIN, W.; TANAKA, M. Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of Blue marlin (Makairamazara). **Food Chemistry**. 100, p. 914–920,2007.

HANANI, Z. A. N.; BEATTY, E.; ROOS, Y. H.; MORRIS, M. A.; KERRY, J. P. Development and Characterization of Biodegradable Composite Films Based on Gelatin Derived from Beef, Pork and Fish Sources. **Foods**. v. 2, p. 1-17; 2013.

HAQUE, M. A.; CHEN, J.; ALDRED, P.; ADHIKARI, B. Drying and denaturation characteristics of whey protein isolate in the presence of lactose and trehalose. *Food Chemistry*. v. 177, p.8–16, 2015.

HIEMENZ, P. C. **Principles of colloid and surface chemistry**, Dekker, New York, 1986.

HERNANDEZ-MUNOZ, P.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. Effect of cross linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 403-411, 2004.

HEMUNG B. O.; CHIN K. B. Effects of fish sarcoplasmic proteins on the properties of myofibrillar protein gels mediated by microbial transglutaminase. **Food Science and Technology**. v. 53, p. 184 - 190, 2013.

HUANG X. et al., Distinct kinetic pathways generate organogel networks with contrasting fractality and thixotropic properties, **J. Am. Chem. Soc.** v. 128, n. 47, p.15341–15352, 2006.

HUF-LONERGAN, E.J.; BEEKMAN, D.D.; PARRISH JUNIOR, F.C. Protein separation and analysis of certain skeletal muscle proteins; principles and techniques. In: HETTIARACHCHY, N.S.; ZIEGLER, G.R. (Eds.). **Protein functionality in food systems**. New York : Marcel Dekker. p. 79-119, 1994.

IWATA, K.; ISHIZAKI, S.; HANDA, A.; TANAKA, M. Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. **Fisheries Science**, v. 66, p. 372-378, 2000.

JIANG, Y.; TANG, C. H.; WEN, Q. B.; LI, L., YANG, X. Q. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 218-225, 2007.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. **Food Bioprocess Technology**. v.4, p.0-0, 2012.

LIMA, M. M., MUJICA P. I. C., LIMA A. M. Caracterização química e avaliação do rendimento em filés de caranha (*Piaractus mesopotamicus*). **Braz. J. Food Technol.**, IV SSA, p. 41-46, 2012.

KARNNET S.; POTIYARAJ P.; PIMPAN V. Preparation and properties of biodegradable stearic acid-modified gelatin films. **Polymer Degradation and Stability**. v. 90, p. 106-110, 2005.

KRISTINSSON, H.; RASCO, B. Fish Protein Hydrolysates and their potential use in the food industry. In Fingerma, M. and Nagabhushanam, R. Recent Advances in Marine Biotechnology 7, **Science Publishers**, Inc. Enfield, NH, 157–181. 2002.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates and Their Potential use in the Food Industry. **Marine Biotechnology**. v. 7, p. 157 – 181, 2002.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G. Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, v. 20, n. 7, p. 1057–1071, 2006.

KOWALCZYK, D.; BARANIAK, B. Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films – A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 195-209, 2014.

KHWALDIA, K.; ARAB-TEHRANY, E.; DESOBRY, S. Biopolymer coatings on paper packaging materials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, n. 1, p. 82-91, 2010.

LEI, L.; ZHI, H.; XIUJIN, Z.; TAKASUKE, I.; ZAIGUI, L. Effects of different heating methods on the production of protein-lipid film. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 292-297, 2007.

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 Food Engineering**, Essex, v. 100, n. 1, p. 85-92, 2010.

LIMPAN, N.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; PRASARPRAN, S. Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly (vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films. **Food Hydrocolloids**. v. 29, p. 226-233, 2012.

LIMPISOPHON, K.; TANAKA, M.; OSAKO, K. Characterisation of gelatine fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. **Food Chemistry**. v.122, n 4, p.1095-1101, 2010.

LODHA, P.; NETRAVAL, A. N. Thermal and mechanical properties of environment-friendly 'green' plastics from stearic acid modified-soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 1, p. 49-64, 2005.

MACIEL V.B.V.; YOSHIDA C.M.P.; FRANCO T.T. Development of a prototype of a colorimetric temperature indicator for monitoring the quality of food. **Journal of Food Engineering**, v.111, p. 21-27, 2012.

MAUER, L. J.; SMITH, D. E.; LABUZA, T. P. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible B-casein films. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5-6, p. 353-358, 2000.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and

barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, v.75, n. 4, p. 453-460, 2006.

MIGUEL V. S.; PEINADO C.; CATALINA F.; ABRUSCI C. Bioremediation of naphthalene in water by *Sphingomonas paucimobilis* using new biodegradable surfactants based on poly (3-caprolactone). **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 63, p. 217-223, 2009.

MINATTI, E. Um novo modelo para a interação entre polímeros neutros hidrossolúveis e surfactantes. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Departamento de Química, Florianópolis, 2005.

MIRANDA, F. F.; PORTO, M. R. A.; PACHECO, R. S. Processo tecnológico destinado à obtenção de flocos de corvina (*Micropogon furnieri*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12. **Anais...** Pelotas: UFPel, 2003. CD-ROM, 2003.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo para elaboração de biofimes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 179-189, 2000.

MORILLON, V.; DEBEAUFORT, F.; BLOND, G.; CAPELLE, M.; VOILLEY, A. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 42, p. 67-89, 2002.

OLIVEIRA T. Z.; LEITE R. H. L.; AROUCHA E. M. M.; NOBRE D. M.; SANTOS F. K. G. Biofilmes de gelatina: Efeito da adição de surfactante e ácidos graxos de óleo de coco na permeabilidade ao vapor de água. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 2012.

OU, S.; WANG, Y.; TANG, S.; HUANG, C.; JACKSON, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 70, n. 2, p. 205-210, 2005.

PARK, H. J.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.25, p.497-507, 1995.

PASCHOALICK, T. M.; GARCIA, F. T.; SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile tilapia. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 419-427, 2003.

PENG, Y.; YIN, LU.; YUNFEI, L. Combined effects of lemon essential oil and surfactants on physical and structural properties of chitosan films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 44-50, 2013.

PERESSINI D.; BRAVIN B.; LAPASIN R.; RIZZOTTI C.; SENSIDONI A. Methylcellulose starch-based edible films: Rheological properties of the film-forming dispersions. **Journal of Food Engineering**, v. 59, n. 1, p. 25-32, 2003.

PÉREVAL, C.; DEBEAUFORT, F.; DESPRÉ, D.; VOILLEY, A. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipids types on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p. 3977-3983, 2002.

PESSATTI, M. L. **Aproveitamento dos subprodutos do pescado**. Meta 11. Relatório final de ações prioritárias ao desenvolvimento da pesca e aquicultura no Sul do Brasil. Convênio Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Universidade do Vale do Itajaí: MA/SARC, n. 003/2000, 2001.

PETERSSON M.; STADING M. Water vapor permeability and mechanical properties of starch-mixed films monoglycerides and effect of the film-forming conditions. **Food Hydrocolloids**, v.19, n. 1, p. 123-132, 2005.

PINHEIRO A.C.; CERQUEIRA M.A.; SOUZA B.W.S.; MARTINS J.T.; TEIXEIRA J.A.; VICENTE A.A. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. Universidade do Minho. Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia. Campus de Gualtar/ Portugal. Outubro/2010.

PIRES C.; RAMOS C.; TEIXEIRA G.; BATISTA I.; MENDES R.; NUNES L.; MARQUES A. Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. **Journal of Food Engineering**. v. 105, n. 3, p. 422–428, 2011.

POMMET, M.; REDL, A.; MOREL, M.H.; GUILBERT, S. Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. **Polymer**.v. 44, p.115–122, 2003.

PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; ARTHARN, A. Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.41, p.605-614, 2007.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. Conformational and rheological changes in catfish myosin during alkali-induced unfolding and refolding. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 385-398, 2008.

RHIM, J. A.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. M. Sodium dodecyl treatment improves properties of cast films from soy protein isolate. **Industrial Crops and products**, Lincoln, v.15, p.199-205, 2002.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 47, n. 4, p. 411-433, 2007.

ROCHA, M. D.; LOIKO, M. R.; GAUTÉRIO, G. V.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming

solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666-673, 2013.

ROCHA, J. M. S., **Boletim de Biotecnologia**. Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia. Coimbra, n.64, p. 5-11, 1999.

RODRÍGUEZ, M.; OSÉS, J.; ZIANI, K.; MATÉ, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**. v. 39, p. 840–846, 2006.

ROJAS-ARGUDO, C., RIO, M. A., PÉREZ-GAGO, M. B. Development and optimization of locust bean gum (LBG)-based edible coatings for postharvest storage of 'Fortune' mandarins. **Postharvest Biology and Technology**. v. 52, p. 227-234, 2009.

RUFINO, R. D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; TEXEIRA, J. A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfactantes B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5, 2011.

SHIKU, Y.; HAMAGUCHI, P. Y.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Effect of surimi quality on properties of edible films based on Alaska pollack. **Food Chemistry**, London, v. 86, n. 4, p. 493-499, 2004.

SHIKU, Y.; HAMAGUCHI, P.; TANAKA, M. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 69, n. 5, p. 1026-1032, 2003.

SOBRAL, P. J.A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, vol. 35, n 6, p 1251-1259. Jun 2000.

SOUZA, S. M. A.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Extração de proteínas miofibrilares de carne bovina para elaboração de filmes comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 619-626, 2004.

TAPIA-BLÁCIDO, D.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C.; SOBRAL, P. J. A.; AÑÓN, M. C. Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. E293 -E300, 2007.

TAQI, A.; ASKAR, K.A.; NAGY, K.; MUTIHAC, L.; STOMATIN, I. Effect of different concentrations of olive oil and oleic acid on the mechanical properties of albumen (egg white) edible films. **African Journal Biotechnology**. v. 10, p. 12963–12972, 2011.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 172–176, 2005.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 758-767, 2011a.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Papéis de oxidação lipídica e pH em propriedades e coloração amarela durante o armazenamento de filme a partir de tilápia vermelha (*Oreochromis niloticus*) proteína muscular. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 426-433, 2011b.

TONGNUANCHAN P.; BENJAKUL S.; PRODPRAN T. Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants. **Food Hydrocolloids**.v. 41, p. 33–43, 2014.

VIEIRA, M., ALTENHOFEN, M., OLIVEIRA, L., MASUMI, M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 254-263, 2011.

VILLALOBOS, R.; CHANONA, J.; HERNÁNDEZ, P.; GUTIÉRREZ, G.; CHIRALT, A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 53-61, 2005.

VILLALOBOS, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CHIRALT, A. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Food Hydrocolloids**. v. 20, p. 502–509, 2006.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L.; TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 531-537, 2013.

WANG, Z.; ZHOU, J.; WANG, X-X.; ZHANG, N.; SUN, X-X.; MA, Z-S. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soybean protein isolate-based oleic acid/stearic acid blend edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 51-58, 2014.

WOLF, K. L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno. 103p. **Dissertação**, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto. 2007.

WONG, D. W. S. Edible chitosan-lipid films: Microstructure and surface energy. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 540-544, 1992.

WU, Y.; WELLER, C. L.; HAMOUZ, F.; CUPPETT, S. L.; SCHNEPF, M. Development and application of multicomponent edible coatings and films: a review. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 44, p. 347-394, 2002.

YANG, L. PAULSON, A T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier

properties of edible gellan film. **Food Research International**, Amsterdam, v.33, n. 7, p. 571-578, 2000.

YE S. Surface molecular structures of Langmuir–Blodgett films of stearic acid on solid substrates studied by sum frequency generation spectroscopy, **Langmuir**. v. 19, n. 6, p. 2238–2242, 2003.

YOSHIDA, C. M. P. A. Aplicação de concentrado protéico de soro de leite bovino na elaboração de filmes comestíveis, **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L.M.; TELLES, A. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. **Brazilian Journal of Food Technology**, IV SSA, p. 53-57, 2012.

ZIANI, K.; OSÉS, J.; COMA, V.; MATÉ, J.I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **Food Science and Technology**. v. 41, p. 2159–2165, 2008.

ZAHEDI, Y.; GHANBARZADEH, B.; SEDAGHAT, N. Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. **Journal of Food Engineering**. v. 100, n. 1, p. 102-108, 2010.