



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)**

CLEIDIANE DA SILVA ARAÚJO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME A PARTIR DE
PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE SUBPRODUTO DE PEIXE**

BELÉM- PA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)**

CLEIDIANE DA SILVA ARAÚJO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME A PARTIR DE
PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE SUBPRODUTO DE PEIXE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação PPGCTA da Universidade Federal do Pará (UFPA) para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço.

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Manoel da Cruz Rodrigues.

BELÉM- PA

2015

CLEIDIANE DA SILVA ARAÚJO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME A PARTIR DE
PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE SUBPRODUTO DE PEIXE**

Data de Avaliação: ____/____/____

Nota: _____ Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
(FEA/ITEC/UFPA – Orientadora)

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
(FEA/ITEC/UFPA – Co-Orientador)

Profa. Dra. Luiza Helena Meller da Silva
(FEA/ITEC/UFPA – Membro interno)

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

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente)

Ao meu avô Pedro Muniz (*in memoriam*) por ter ensinado-me os valores da vida, aos meus tios Paulo Diniz e Francisca pelo amor, carinho e incentivo. A minha mãe por depositar em mim a confiança de todas as horas.

Com amor dedico.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

Agradeço...

Á Deus, meu refúgio e fortaleza e por ter permitido chegar até aqui.

Á minha orientadora, a Professora Dra. Lucia Lourenço, pela paciência, críticas, conselhos, orientação, amizade, risadas e a oportunidade de trabalhar ao seu lado. Obrigada por me transformar em uma pessoa melhor, pessoal e profissionalmente.

Á todos os professores do mestrado por compartilhar seus conhecimentos, especialmente os Profs. Eder Araújo e Rosinelson Pena, obrigada pela ajuda e sugestões que engrandeceram este trabalho, principalmente na estatística.

Ao co-orientador, Professor Dr. Antonio Rodrigues, quem tornou possível a realização dos testes mecânicos no Laboratório de Medidas Físicas (LAMEFI).

A Prof^a. Dra. Suezilde da Conceição Amaral Ribeiro, pelas considerações e apoio, muitíssimo obrigada.

Ao Rogério Vieira, por sempre tranquilizar-me com a estatística, eternamente grata.

Á minha família, que estiveram sempre ao meu lado compartilhando meu ideal, pelo estímulo e carinho dedicados.

Á minhas amigas, em especial Heloisa Quitério e Milena Passos pela amizade verdadeira, incentivo e apoio nas horas difíceis.

Ao Claudio Matias, pelo amor, cumplicidade, momentos de alegria, tranquilidade e a extrema paciência.

Aos colegas do Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) eternamente LaPesca, obrigada pelo suporte, amizade e companheirismo.

À pós-graduação PPGCTA pela infraestrutura oferecida e a secretária Hadriane pelas informações, apoio e conversas ao longo do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. GENERALIDADES DO PESCADO.....	16
2.1.1. Produção pesqueira.....	16
2.1.2. Resíduos da indústria de filetagem de pescado.....	17
2.2. PROTEÍNAS.....	18
2.2.1. Proteínas sarcoplasmáticas.....	18
2.2.2. Proteínas miofibrilares.....	19
2.2.3. Proteínas Estromáticas.....	20
2.3. BIOFILME.....	20
2.3.1. Mecanismos de formação de biofilme.....	21
2.3.2. Propriedades de biofilmes à base de proteínas.....	22
2.3.2.1. Propriedades de barreira.....	22
2.3.2.2. Permeabilidade ao vapor da água.....	22
2.3.2.3. Propriedades mecânicas.....	23
2.3.2.4. Propriedades térmicas.....	23
2.3.2.5. Propriedade de solubilidade.....	24
2.4. FATORES QUE AFETAM AS PROPRIEDADES DE BIOFILMES	25
2.4.1. pH.....	25
2.4.2. Concentração de proteínas.....	26
2.4.3. Plastificantes.....	26
2.4.4. Tratamento térmico.....	27
2.5. DOURADA (<i>Brachyplatystoma roussauxii</i>).....	28
2.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
2.6.1. Planejamento fatorial fracionário.....	29
2.6.2. Planejamento fatorial completo.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. MATERIAL.....	31
3.1.1. Matéria-Prima.....	31
3.2. MÉTODOS.....	31
3.2.1. Composição centesimal e cor instrumental da matéria-prima.....	31

3.2.2. Extração das proteínas miofibrilares.....	32
3.2.3. Caracterização das proteínas miofibrilares liofilizadas.....	33
3.2.3.1. Composição de aminoácidos.....	33
3.2.3.2. Microestrutura.....	33
3.2.4. Obtenção do biofilme.....	33
3.2.5. Determinação das variáveis no processo de obtenção do biofilme através do planejamento fracionário.....	34
3.2.6. Delineamento composto central rotacional.....	35
3.2.7. Caracterização do biofilme.....	37
3.2.7.1. Espessura do biofilme.....	37
3.2.7.2. Propriedades mecânicas.....	37
3.2.7.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	37
3.2.7.4. Solubilidade do biofilme.....	38
3.2.7.5. Transmissão de luz e Transparência.....	38
3.2.7.6. Cor.....	38
3.2.7.7. Caracterização microscópica da superfície e secção transversal do biofilme.....	39
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO E DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS.....	40
4.1.1. Caracterização física e centesimal do resíduo e das proteínas miofibrilares liofilizadas.....	40
4.1.2. Perfil de aminoácidos das proteínas miofibrilares.....	42
4.1.3. Caracterização da microestrutura matéria prima.....	44
4.2. DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO BIOFILME.....	45
4.3. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO.....	49
4.3.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	50
4.3.2. Elongação (E).....	53
4.4. DESEJABILIDADE.....	56
4.5. CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME OTIMIZADO.....	58
4.5.1. Elongação.....	58
4.5.2. Resistência a tração.....	58
4.5.3. Espessura.....	59
4.5.4. Permeabilidade ao vapor de água.....	60
4.5.5. Solubilidade.....	60

4.5.6. Cor instrumental.....	61
4.5.7. Transmissão de luz e transparência.....	61
4.5.8. Morfologia da superfície e secção transversal do biofilme otimizado.....	63
5. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE A.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Classificação das proteínas do músculo do peixe.....	18
Figura 2: Dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxi</i>).....	29
Figura 3: Resíduo da dourada.....	31
FIGURA 4: Microfotografias das proteínas miofibrilares liofilizadas: A (50 X), B (240 X) e C (2500 X).....	44
Figura 5: Superfície de resposta e curvas de nível para PVA, relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (%) e concentração de plastificante (%) na obtenção de biofilme.....	52
Figura 8: Superfície de resposta e curvas de nível para porcentagem de alongação, relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (%) e concentração de plastificante (%) na obtenção de biofilme.....	55
Figura 9: Perfis dos valores preditos e Desejabilidade para concentração de PML e plastificante na obtenção de biofilme.....	57
Figura 10: Biofilme obtido com proteínas miofibrilares de dourada com 1% de PML e 40% de plastificante.....	62
Figura 11: Microfotografias da superfície do biofilme (0,79% PML e 40% Plastificante); 50X e 5000X.....	63
Figura 12: Microfotografias da superfície do biofilme (0,79% PML e 40% Plastificante); 50X e 5000X.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1: Definição dos níveis das cinco variáveis estudadas na obtenção do biofilme.....	34
Tabela 2: Planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) com valores codificados e reais.....	35
Tabela 3: Definição dos níveis das duas variáveis estudadas na obtenção do biofilme.....	36
Tabela 4: Planejamento fatorial completo composto central rotacional (2^2) com valores codificados e reais.....	36
Tabela 5: Composição física e físico-química do resíduo e das proteínas miofibrilares.....	40
Tabela 6: Perfil de aminoácidos da proteína miofibrilar liofilizada da dourada (g/100g de proteína).....	42
Tabela 7: Delineamento fracionário das variáveis independentes com suas respectivas respostas	45
Tabela 8: Contrastes estimados das variáveis, coeficiente t e significância estatística, no delineamento fracionário para permeabilidade ao vapor de água.....	46
Tabela 9: Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e significância estatística, no delineamento fracionário para resistência à tração.....	47
Tabela 10: Contrastes estimados das variáveis, coeficiente t e significância estatística, no delineamento fracionário para % Elongação.....	48
Tabela 11: Resultados experimentais para otimização de biofilme.....	50
Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para PVA, referente à otimização de biofilme.....	51
Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para elongação, referente à otimização de biofilme.....	54
Tabela 18: Valores otimizados obtidos com metodologia de superfície de resposta e verificação experimental.....	56
Tabela 19: Caracterização mecânica, física, química e barreira do biofilme otimizado.....	58
Tabela 20: Transmissão de luz e transparência do biofilme otimizado.....	62

RESUMO

Biofilmes são caracterizados como materiais de fina espessura, preparados a partir de macromoléculas biológicas, que age como barreira a elementos externos (umidade, gases e óleos) e consequentemente, protege o produto e aumenta sua vida comercial. As proteínas miofibrilares de peixe têm excelentes propriedades de formação de biofilme. O objetivo deste trabalho foi à obtenção e caracterização de biofilme desenvolvido a partir de proteínas miofibrilares de subprodutos de dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*). Foi estudada a caracterização do subproduto e das proteínas liofilizadas indicando que a matéria prima apresentou elevada concentração de proteína miofibrilar (96,58%) importante para a formação da matriz biopolimérica. Realizou-se dois planejamentos estatísticos, a priori estudou-se simultaneamente cinco variáveis envolvidas no processo, através de um planejamento fracionário 2^{5-1} , demonstrando que apenas a concentração de proteínas e plastificante apresentaram influencia significativa e que, por tanto, estas foram submetidas ao segundo planejamento Composto Centra Rotacional para definir a região de melhores propriedades mecânica, física e de barreira. O biofilme otimizado foi elaborado com 0,79 % de PML e 40% de plastificante. A temperatura do banho-maria utilizado na formação da solução filmogênica foi fixada a 50 °C, a temperatura e tempo de secagem do biofilme a 25°C por 16 horas respectivamente. Quanto as propriedades do biofilme desenvolvido apresentou-se com 178,08% de alongação, 4,91 MPa de resistência a tração, 0,033 mm de espessura, $6,42 \times 10^{-11}$ g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹ de permeabilidade ao vapor de água e 19,46% de solubilidade. A microestrutura do biofilme revelou uma estrutura pouco homogênea, porém coesa e densa. O biofilme exibiu características promissoras apresentando aspectos homogêneos, transparentes, resistentes e flexíveis, além de baixa solubilidade e permeabilidade ao vapor de água podendo ser um meio para promover o uso de resíduos em grande parte descartados pela indústria processadora de pescado.

Palavras-chave: Biofilme; Proteínas miofibrilares; Subproduto de peixe.

ABSTRACT

Biofilms are characterized as thin materials prepared from biological macromolecules, which acts as a barrier to external elements (moisture, gases and oils) and thus protects the product and enhances its commercial life. The fish myofibrillar proteins have excellent properties of biofilm formation. The objective of this study was to obtain and characterize biofilm developed from myofibrillar protein Golden products (*Brachyplatystoma roussauxii*). Characterization by product and lyophilized proteins indicating that the raw material had a high concentration of myofibrillar protein (96.58%) important to the formation of the biopolymer matrix was studied. It carried out two statistical planning a priori studied simultaneously five variables involved in the process through a fractional plan 2^{5-1} , demonstrating that only the concentration of protein and plasticizer showed significant influences and that, therefore, they were subjected to the second planning Compound Rotational Centra to define the region of better mechanical properties and physical barrier. The optimized biofilm was made with 0.79% of PML and 40% plasticizer. The temperature of the bath used in the formation of the filmogenic solution was set at 50 ° C, the biofilm temperature and the drying time at 25 ° C for 16 hours respectively. The properties of the biofilm had developed up to 178.08% elongation 4.91 MPa of tensile strength, 0.033 mm thick, $6,42 \times 10^{-11}$ g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹ permeability to water vapor and 19.46% solubility. The microstructure of the biofilm showed a poorly homogeneous structure, though dense and cohesive. The biofilm characteristics exhibited promising aspects presenting homogeneous, transparent, flexible and resistant, in addition to low solubility and permeability to water vapor may be a means to promote the use of waste largely discarded by the fish processing industry.

Keywords: Biofilm; Myofibrillar proteins; Fish-product.

1 INTRODUÇÃO

A embalagem é usada para proteger e manter a qualidade do produto alimentício e para isso são empregados materiais para a sua preparação, porém a maior parte é feita de plásticos por apresentar boas propriedades mecânicas, eficácia como barreira ao oxigênio e a água, no entanto, a utilização desses materiais sintéticos representa um sério problema ecológico, devido à sua não biodegradabilidade (PIRES et al., 2011).

Neste contexto, surgiu o interesse em desenvolvimento de biofilmes com características de embalagens biodegradáveis, que não causam danos ao meio ambiente, contribuem para redução dos problemas ambientais causados pelo uso indiscriminado de resíduos plásticos à base de petróleo (DAVANÇO et al., 2007; ARRIETA et al., 2014).

Os filmes biodegradáveis podem ser elaborados a partir de polímeros naturais como proteínas, polissacarídeos e lipídeos ou da combinação destes compostos (RHIM; NG, 2007). Esforços têm sido feitos para desenvolver filme de biopolímeros para a produção alternativa de embalagem ecológica, formados a partir de macromoléculas biológicas, como as proteínas, que são heteropolímeros constituídos por uma diversidade de aminoácidos, os quais podem ser submetidos a uma grande variedade de interações e de reações químicas (LIMPAN et al., 2010).

Apesar das proteínas de origem vegetal serem amplamente estudadas (MATTA et al., 2011; JIPA, et al., 2012; GARRIDO et al., 2014) provavelmente devido à sua abundância e baixo custo nos países desenvolvidos, estudos recentes demonstraram que as proteínas animais possuem excelente capacidade de formação de biofilmes, especificamente as proteínas de carne bovina (SOBRAL, 2000; SOUZA; SOBRAL; MENEGALLI, 2012) e de peixes (LIMPAN et al., 2012; ZAVAREZE et al., 2012; ARFAT et al., 2014).

Os biofilmes formados com proteínas de peixe apresentam propriedades funcionais interessantes como a habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, além de apresentar uma boa barreira ao oxigênio. No entanto, sua barreira ao vapor de água é baixa em razão da sua natureza hidrofílica, esta característica pode ser modificada pela adição de plastificantes e/ou aditivos (ZAVAREZE et al., 2012).

Inúmeros estudos têm sido publicados sobre caracterização das propriedades funcionais de biofilmes à base de proteínas de peixe (CHINABAHARK et al., 2007; RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008; HOQUE et al., 2011; PRODPRAN et al.,

2012). Cuq et al. (1995) estudaram a influência do pH, da concentração de proteína, e da temperatura no preparo da solução de biofilmes produzidos a partir de proteínas miofibrilares de sardinha (*Sardina pilchardus*) e demonstraram que estas têm excelentes propriedades filmogênicas, isto é, sob certas condições de tratamento térmico, e sobretudo de pH, as proteínas miofibrilares são capazes de formar uma matriz contínua, sendo possível assim, a produção de material fino e flexível, ou seja, biofilme.

Entre as várias proteínas de pescado, as miofibrilares podem ser usadas para preparar solução formadora de filme. Estas proteínas são encontradas em subprodutos da indústria de filetagem de pescados (resíduos). Sabendo que a indústria pesqueira gera um volume de resíduo superior a 50%, em média, e ciente do alto teor de proteínas destes resíduos, faz-se necessário um melhor aproveitamento deste material (GONÇALVES, 2011).

Assim, este trabalho teve como objetivo geral obter e avaliar o biofilme elaborado a partir de proteínas miofibrilares de resíduo da dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*).

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar o resíduo da dourada, através de análises físicas e químicas;
- Extrair proteínas miofibrilares do resíduo da dourada;
- Avaliar as características físicas, químicas e rendimento das proteínas miofibrilares extraídas do resíduo da dourada;
- Elaborar biofilme utilizando as proteínas miofibrilares da dourada;
- Selecionar as variáveis que influenciam na obtenção do biofilme através do planejamento fracionário;
- Otimizar o processo de obtenção de biofilme utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta;
- Avaliar as características físicas, mecânicas e de barreira do biofilme otimizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DO PESCADO

2.1.1. Produção pesqueira

Segundo o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, a produção mundial de pescado (pesca extrativa e aquicultura) atingiu aproximadamente 168 milhões de toneladas em 2010. Os maiores produtores foram a China, a Indonésia e o Peru. Neste cenário, o Brasil contribuiu com 1.264.765 toneladas da produção em 2010, ocupando a posição 19º no ranking geral dos maiores produtores de pescado do mundo. A atividade de pesca extrativa aumentou 2,3%, com uma produção de mais de 800 mil toneladas. Ao todo, a produção pesqueira nacional alcançou 1,43 milhão de toneladas em 2011, ou seja, 13,2% a mais do que no ano 2010. Considerando-se apenas os países da América do Sul, o Brasil aparece em terceiro lugar, logo à frente da Argentina que produziu cerca de 814 mil toneladas de pescado (BRASIL, 2015a).

O Brasil é banhado por uma costa marítima de 8,5 mil quilômetros e possui 12% de toda a água doce do planeta, e ainda 8,2 bilhões de metros cúbicos de água distribuídos em rios, lagos, açudes e represas. Com condições ambientais e climáticas favoráveis a tanta riqueza natural, tem potencial para se tornar um dos maiores produtores de pescado no mundo (BRASIL, 2015b).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o pescado é a proteína animal mais saudável e consumida no mundo. Os brasileiros ultrapassaram o consumo mínimo de pescado recomendado de 12 quilos por habitante ao ano. No Brasil, o consumo chega a 14,50 quilos por habitante/ano de acordo com o levantamento feito em 2013 (BRASIL, 2015b).

De acordo com o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, a produção de pesca extrativa continental em 2011 foi de 249.600,2 toneladas e a região Norte novamente se manteve como o maior produtor desta modalidade, com 137.144,5 toneladas, sendo responsável por 55% da captura total (BRASIL, 2015b).

O estado do Pará se destaca como o maior produtor de pescado do Brasil, que segundo a Secretária de Pesca e Aquicultura do Pará, no ano de 2013 o Pará totalizou uma produção de 728.393,80 toneladas de pescado, sendo 670.961 da pesca artesanal (92,1%); 41.250 da pesca industrial (5,7%) e 16.182 da piscicultura (2,2%). O Estado ultrapassou Santa Catarina, que até 2012 estava no primeiro lugar do

ranking da produção de pescado no país (SEPAQ, 2015). Além de se destacar como o segundo maior estado, contribuindo com 15,8% da produção nacional.

2.1.2. Resíduos da indústria de filetagem de pescado

Os resíduos do processamento da indústria de pesca são considerados matérias-primas de qualidade e de baixo valor comercial, que não são utilizados na maioria dos casos, tornando-se dejetos que causam prejuízos ecológicos, sanitários e econômicos. Desta forma, o emprego do subproduto do processamento de pescado na elaboração de novos produtos deve ser realizado na efetivação de uma empresa limpa, o que aumentaria a receita e contribuiria para a preservação ambiental (MINOZZO, 2010).

As cabeças, escamas, peles, vísceras, carcaças e aparas da filetagem são os principais resíduos do processamento de pescado. Dependendo da espécie de peixe processada e do produto final obtido pelo frigorífico, estes resíduos podem representar algo entre 8 a 16% (no caso do pescado eviscerado), e entre 60 e 72%, na produção de filés sem pele (KUBITZA, 2006).

No Brasil, o aproveitamento dos resíduos de pescado é restrito e milhares de toneladas desse subproduto são produzidos e descartados pelas unidades beneficiadoras de pescado em razão, principalmente, da falta de reconhecimento deste recurso como matéria-prima, fonte para outros produtos e também pela falta de um destino adequado, levando a um descarte no meio ambiente gerando sérios problemas de poluição ambiental (BORGHESI, 2004).

Os tipos e a quantidade de resíduos gerados na industrialização de pescado dependem da espécie de processamento empregado: peixe inteiro eviscerado, eviscerado e descabeçado, filé, dentre outras. As quantidades relacionam-se ao rendimento de carcaça dos peixes, que varia em função do tipo de processamento, da espécie e tamanho do peixe, entre outros fatores. Neste contexto, cabe destacar que as operações de abate e filetagem de peixe podem levar as grandes montantes de resíduos, que consiste de vísceras, cabeças, pele, ossos e aparas da filetagem (FALCH et al., 2006).

Nas diversas etapas da cadeia produtiva da indústria de alimentos, desde a produção até a comercialização no varejo, é gerada uma quantidade significativa de resíduos. Diante disso, as indústrias alimentícias sejam de origem animal ou vegetal vêm sofrendo uma tendência mundial que é a crescente pressão para se tornarem mais

responsáveis com meio ambiente, sendo assim obrigadas a viabilizarem formas diferentes de utilização destes resíduos (AGUIAR; GOULART, 2013).

2.2. PROTEÍNAS

A maioria dos componentes nitrogenados do pescado faz parte das proteínas; no entanto, o tecido muscular contém igualmente compostos nitrogenados não proteicos. O conhecimento da composição e das propriedades dos diversos componentes nitrogenados é de grande relevância prática, uma vez que as características próprias do músculo dependem, em grande parte, da concentração e da proporção desses componentes (GONÇALVES, 2011).

De acordo com Ogawa e Maia (1999), as proteínas musculares do pescado são classificadas de acordo com a solubilidade em: proteínas sarcoplasmáticas, miofibrilares e do estroma (Figura 1).

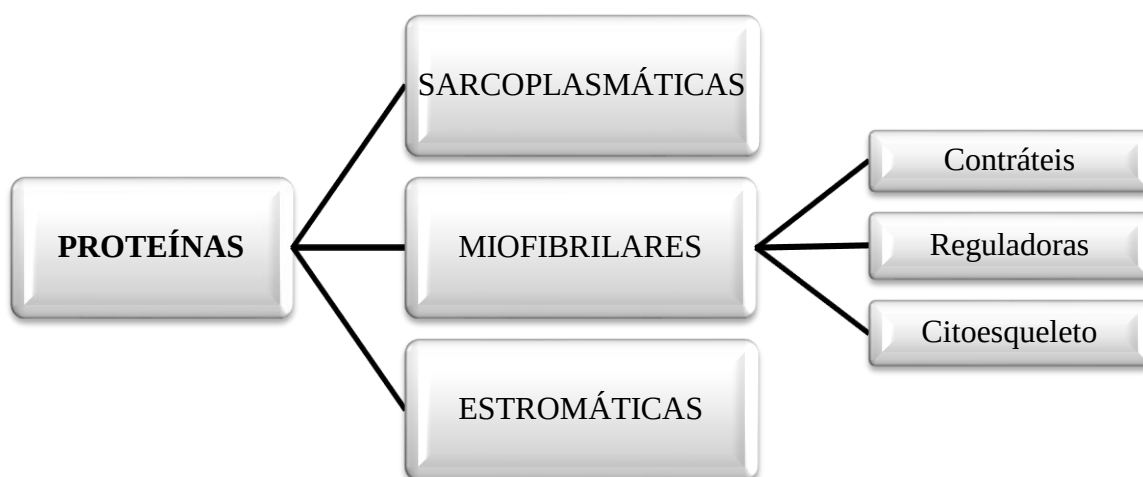


Figura 1: Classificação das proteínas do músculo do pescado

2.2.1. Proteínas sarcoplasmáticas

As proteínas sarcoplasmáticas ou fração miogeno do músculo têm a propriedade de ser solúveis em água e em soluções salinas diluídas. Compreendem as proteínas do sarcoplasma, as integrantes do líquido extracelular e as proteínas presentes nas pequenas partículas do sarcoplasma. As proteínas sarcoplasmáticas compreendem 30% do total das proteínas do músculo do pescado. O grupo das albuminas é composto por mais de 100 proteínas diversas, com ampla variedade de pesos musculares e pontos isoelétricos, sendo que a maioria tem atividade enzimática. Aqui estão incluídas as proteínas ligadas a ácidos nucleicos, os componentes das lipoproteínas e as cromo proteínas do músculo e do sangue (OETTERER, 1999).

2.2.2. Proteínas miofibrilares

As proteínas miofibrilares são proteínas contidas nas células musculares, formadoras dos tecidos esqueléticos e em grande parte, responsáveis pelo fenômeno de contração muscular. Do ponto de vista alimentar, as proteínas miofibrilares são as principais proteínas do músculo do peixe, medindo cada fibra de 0,01 a 0,1 mm de comprimento por 1 a 2 μ m de diâmetro. As proteínas são solúveis em soluções salinas de alta força iônica ($i \geq 0,5$) (OGAWA; MAIA, 1999).

As proteínas miofibrilares compreendem 40 a 60% do total proteico. São basicamente a miosina e a actina. Estas proteínas é que se complexam, formando a actomiosina, no momento do “rigor mortis”, são também responsáveis pela capacidade do pescado em reter água, pelas propriedades sensoriais e pela capacidade de formação de gel. A miosina constitui de 50 a 60% da fração miofibrilar e a actina, 15 a 20% (OETTERER, 1999).

As proteínas miofibrilares são normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH da solução. Essas proteínas, que são completamente estendidas, apresentam cadeias de polipeptídios fortemente associadas entre si, em estruturas paralelas (IWATA et al., 2000).

As proteínas miofibrilares podem ser divididas em três subgrupos: contráteis, reguladoras e do citoesqueleto (SIKORSKI, 1990; XIONG, 1997).

As proteínas contráteis incluem a miosina e actina que são diretamente responsáveis pela contração muscular. A miosina é constituída por seis subunidades de polipeptídios, duas cadeias pesadas e quatro leves. As duas cabeças globulares com atividade ATPase são relativamente hidrofóbica e são capazes de se ligarem à actina (McCORMICK, 1994; XIONG, 1997).

Quando miosina é digerida por tripsina ou quimotripsina durante um curto período, ela é dividida em dois monômeros de cadeias pesadas, com um tamanho de 220.000 Daltons, dependendo das espécies e do tipo de fibras (XIONG, 1997). A miosina é responsável por uma série de propriedades como a gelificação, retenção de água e emulsificação (RAGHAVAN; KRISTINSSON, 2008).

Cada molécula de actina contém cinco grupos sulfidríla e um local de ligação, o que permite formar complexos de miosina temporários que podem ser divididos por compostos de alta energia tais como ATP em forças iônicas elevadas (XIONG; BREKKE, 1989).

As principais proteínas reguladoras são as tropomiosina e troponina, localizada sobre os filamentos finos, a primeira representa cerca de 8-10% do total das proteínas miofibrilares. A molécula de tropomiosina consiste em aminas ácidas e básicas com ponto isoelétrico de 5,1 (SUZUKI, 1981; XIONG; BREKKE, 1989). A troponina é uma proteína globular encontrada em filamento fino com um peso molecular de 37.000 Daltons.

As proteínas do citoesqueleto incluem a titina, nebulina, desmina e outras proteínas. Proteínas do citoesqueleto funcionam para apoiar e estabilizar as proteínas contráteis do músculo.

2.2.3. Proteínas Estromáticas

O estroma é o resíduo remanescente após a extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares, é composto pelas principais proteínas do tecido conjuntivo (colágeno e elastina), reticulina e agregados desnaturados de proteínas miofibrilares e, possivelmente, por proteínas sarcoplasmáticas que perderam a sua solubilidade característica. O estroma é insolúvel em soluções diluídas de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, ou seja, não podem ser extraídas com água e nem com soluções alcalinas ou ácidas (MESQUITA, 1998).

Entre os constituintes minoritários dos pescados encontram-se os sais minerais, cujo teor varia de 1,0% a 2,0%, os carboidratos, que, no caso dos peixes, representam cerca de 1,0% da sua composição, e substâncias nitrogenadas não proteicas, sem relevância nutricional, que correspondem a cerca de 0,5% no músculo dos peixes *in natura* (BADOLATO et al., 1994).

2.3. BIOFILME

Filmes são estruturas utilizadas para envolver produtos. Ao serem completamente degradados por micro-organismos consideram-se biodegradáveis, sendo chamados de biofilmes, caracterizados como materiais de fina espessura, preparados a partir de macromoléculas biológicas, que age como barreira a elementos externos (umidade, gases e óleos) e consequentemente, protege o produto e aumenta sua vida comercial. Eles podem também carregar compostos antimicrobianos e antioxidantes (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

Essas propriedades dependem do biopolímero usado (conformação, peso molecular, distribuição de cargas, polaridade), das condições da fabricação (pH, concentração de proteínas na solução filmogênica, tratamento térmico da solução, tipo

e teor de plastificante) e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa), importantes por causa da natureza higroscópica dos biopolímeros e do plastificante. (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

Os biopolímeros derivados de matérias-primas naturais como polissacarídeos, proteínas e lipídeos são considerados como potenciais substitutos para filmes plásticos não biodegradáveis tradicionais por apresentarem baixo custo, fácil disponibilidade de recursos reprodutíveis e biodegradabilidade (JANJARASSKU; KROCHTA, 2010).

2.3.1. Mecanismos de formação de biofilme

Para a formação de biofilmes, vários componentes são necessários, cada um com sua finalidade. Guilbert e Gontard (2005) explicam que, na formulação de bioplásticos, deve haver um componente capaz de representar uma matriz, ou seja, um polímero que tenha coesão e continuidade, formando estruturas contínuas, amorfas ou cristalinas. Além da matriz (geralmente uma macromolécula), são necessários o solvente (água, etanol ou outros) e o plastificante (glicerol ou sorbitol) e ajustadores de pH (ácido acético ou hidróxido de sódio).

Um dos processos amplamente utilizados na elaboração de biofilmes é a técnica denominada “*casting*”, que compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula adicionada ou não de aditivos, aplicação dessa solução num suporte adequado, seguida de secagem em condições controladas (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

A formação de biofilmes inicia-se com a formação do gel, envolvendo ligações inter e intra-moleculares cruzadas entre as cadeias de polímeros, formando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (KESTER; FENNEMA, 1986). O grau de coesão depende da estrutura do polímero, do solvente usado, da temperatura, e a presença de outras moléculas, como os plastificantes (THARANATTHAN, 2003).

Após a secagem, então, se obtém filmes, estruturas independentes disponíveis para serem adicionadas ao alimento desejado, ou seja, podem ser colocadas na periferia do alimento ou na forma de camadas contínuas entre compartimentos de um mesmo alimento (GUILBERT; BIQUET, 1995; GUILBERT et al., 1996).

Ainda segundo Marquié e Guilbert (2002), biofilmes à base de proteínas podem ser formados em três etapas:

- I.** Intervalos intra e intermolecular (não covalente e covalente) que estabilizam polímeros em suas formas nativas usando agentes químicos ou físicos (por solubilização ou tratamento térmico). Como resultado, as cadeias poliméricas tornam-se móveis.
- II.** Dispor e orientar as cadeias poliméricas celulares na forma desejada.
- III.** Permitir a formação de novas ligações intermoleculares e interações para estabilizar a rede tridimensional. A forma obtida no passo II é mantida pelos agentes utilizados no passo I (por exemplo, remoção do solvente).

Com base nestes três passos, o processo baseia-se em solvente dispersante e solubilização das proteínas em vários solventes e, em sequência o espalhamento, seguida por secagem. Este processo tem sido extensivamente estudado e aplicado para produzir biofilmes de várias proteínas, particularmente de proteínas miofibrilares (CUQ et al., 1995).

2.3.2. PROPRIEDADES DE BIOFILMES À BASE DE PROTEÍNAS

Biofilmes de proteína possuem diferentes propriedades, de acordo com as fontes de proteína, concentração, fatores extrínsecos, etc.

2.3.2.1. Propriedades de barreira

Segundo Sarantópoulos (2002) as propriedades de barreira são definidas como a capacidade de resistir à absorção ou à evaporação de gases e vapores, resistir à permeação de lipídeos e à passagem de luz.

Biofilmes a base de proteína têm muitas vantagens por ser de excelente barreira ao oxigênio e ao de dióxido de carbono (GENNADIOS et al., 1994), mas a sua natureza hidrofílica faz deles bastantes ineficazes à barreira à umidade (ROY et al, 2000; McHUGH; KROCHTA, 1994). Sobral et al., (2000) investigaram a eficiência da espessura do biofilme sobre as propriedades dos mesmos a base de proteínas miofibrilares, verificando que as propriedades de barreira dos filmes obtidos diminuem com o aumento da espessura, entretanto, a propriedade de barreira pode ser variada de acordo com a fonte de proteína.

2.3.2.2. Permeabilidade ao vapor da água

As embalagens têm como função proteger o produto da ação de gases, luzes, odores e vapor da água, além dos danos físicos que possam ser causados ao produto. Devem, também, constituir uma barreira que impeça ou dificulte o contato entre o

ambiente externo e o produto em seu interior (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Para os biofilmes hidrofílicos, a permeabilidade ao vapor da água é uma das propriedades mais discutidas, pois é influenciada pelas características intrínsecas do material, pelo teor do plastificante e pelas condições ambientais de umidade relativa e temperatura às quais se encontram expostos (MÜLLER et al., 2008).

A propriedade de permeabilidade ao vapor da água deve ser levada em consideração quando se determina as possíveis aplicações dos filmes como embalagens (MORAES, 2009). Biofilmes muito permeáveis ao vapor da água não podem ser usados para embalar produtos que não possam absorver água como, por exemplo, os produtos desidratados. As propriedades de barreira dependem de vários aspectos, tais como: área, espessura, tempo de permeação, temperatura, densidade, coeficiente de solubilidade do polímero com a água, morfologia e concentração das macromoléculas. A presença de plastificantes nos polímeros faz com que aumente a taxa de difusão (MORAES, 2009).

2.3.2.3. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos biofilmes de proteínas são geralmente menos eficiente do que filmes sintéticos (GENNADIOS et al., 1994; CUQ, 2002). Vários fatores, incluindo encargos de superfície, hidrofobicidade, comprimento da cadeia de polímero, etc. podem afetar significativamente as propriedades mecânicas de películas a base de proteínas (KESTER; FENNEMA, 1986). As ligações de hidrogênio são consideradas importantes, pois contribuem para a resistência à tração de filmes de proteínas (KROCHTA, 2002). O nível e o tipo de agente plastificante tem um efeito significativo sobre as propriedades dos biofilmes (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997; CUQ, 2002). Lim et al. (1998) relataram que os biofilmes obtidos a base de ovo branco com conteúdos mais elevados de glicerol tiveram maior alongamento na ruptura. A distribuição e a concentração das interações inter e intramoleculares permitidos pela estrutura primária e espacial são mais susceptíveis de afetar as propriedades mecânicas dos filmes a base de proteínas miofibrilares.

2.3.2.4. Propriedades térmicas

A análise térmica é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Os resultados são fornecidos na forma de curvas,

as quais contêm as informações a respeito da variação do parâmetro medido (WENDLANDT, 1986; LUCAS et al., 2001).

As mudanças termodinâmicas podem ser medidas com técnicas calorimétricas, como a calorimetria diferencial de varredura (DSC). A análise de DSC mede a diferença de energia necessária à substância e a um material de referência que seja inerte termicamente, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura, de forma que a amostra e a referência sejam mantidas em condições isotérmicas, uma em relação à outra, independente do evento térmico que esteja ocorrendo na amostra (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

Esta análise mede as temperaturas e o fluxo de calor associados com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Estas medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos (transferência de calor da referência para a amostra) como transições de fase, desidratações, reduções e algumas reações de decomposição, e exotérmicos (fluxo de calor da amostra para a referência) como cristalização, oxidação, reações de decomposição, ou mudanças na capacidade calorífica (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

2.3.2.5. Propriedade de solubilidade

A solubilidade em água é uma importante propriedade dos biofilmes no que se refere às suas aplicações. Biofilmes com alta solubilidade podem ser interessantes para embalagens de alimentos desidratados que devam sofrer uma hidratação prévia ao consumo. Por outro lado muitas aplicações demandam embalagens resistentes à água, como no caso de alimentos com alta atividade de água, ou mesmo para se evitar a transpiração de produtos frescos (MONTERREY-QUINTERO, 1998).

De acordo com Muller, Yamashita e Laurindo (2008), a solubilidade é influenciada pelo tipo e pela concentração do plastificante. Constataram ainda, que o glicerol e os grupamentos (-OH) do sorbitol aumentaram os valores de solubilidade do filme. Para o armazenamento é requerida uma baixa solubilidade do filme, porém para alimentos que sofrerão cocção com os filmes, uma solubilidade alta é desejada.

A solubilidade em água interfere na propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes comestíveis. A obtenção de filmes com boas propriedades de barreiras ao vapor de água, isto é, com baixa permeabilidade dentro de uma grande faixa de

umidade relativa, implica na utilização do material insolúvel ou de pouca solubilidade em água (CARVALHO et al., 2000).

2.4. FATORES QUE AFETAM AS PROPRIEDADES DE BIOFILMES

Vários fatores afetam a formação do filme, tais como: as propriedades da película, concentração de proteína, pH, temperatura e tempo de armazenamento do biofilme (CUQ et al., 1995).

2.4.1. pH

A carga líquida da molécula de proteína em qualquer valor de pH é uma consequência do estado de ionização de todos os ácidos. No ponto isoelétrico (Pi), as moléculas de proteína com grandes dipolos se atraem e tendem a precipitar. O ponto isoelétrico da proteína miofibrilar varia de 5,5 a 6,5 aumentando ou diminuindo o pH resultará em carga negativa ou positiva das proteínas miofibrilares (BERTRAM et al., 2004).

Hamagchi et al. (2007) trabalharam com o efeito do pH sobre a solubilidade de proteínas de biofilmes constatando com sucesso a formação de filmes flexíveis e semi-transparentes a partir de proteínas de peixe sob condições de variação de pH de 1-4 e de 10-12.

Os biofilmes não são formados em pH de 5 a 7, esta região está próxima do ponto isoelétrico das proteínas as quais são coaguladas e impedidas de se associarem e formarem biofilmes. Em pHs extremos é possível a formação das soluções filmogênicas (SHIKU et al., 2003). Estas observações são consistentes com as descobertas anteriores de Cuq et al. (1996) que explicaram esse comportamento pela desnaturação das proteínas em função do pH.

Condições que favoreçam o aumento de cargas positivas ou negativas, como a alteração do pH, aumentam a solubilidade, e a maior solubilidade das proteínas na solução favorece a interação intermolecular incrementando as propriedades mecânicas dos biofilmes (CUQ et al., 1995; MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 1999).

As proteínas miofibrilares são normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH da solução. Essas proteínas apresentam cadeias de polipeptídeos fortemente associadas entre si, em estruturas paralelas (IWATA et al., 2000). Em razão disso, são compostos capazes de formar uma matriz contínua durante a secagem da solução (CUQ et al., 1995; MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

2.4.2. Concentração de proteínas

A concentração de proteínas na solução filmogênica também pode influir na formação da matriz proteica. A elaboração de biofilmes com isolado proteico de soro do leite, por exemplo, exige uma concentração relativamente elevada de proteínas na solução para que ocorra a formação de pontes S-S (PEREZ; GAGO; KROCHTA, 2001). Entretanto, as proteínas do músculo de peixe, quando solubilizadas pela variação do pH, proporcionam soluções coloidais extremamente viscosas (CUQ et al., 1995).

Quando se trabalha com alta concentração de proteínas na solução filmogênica, essa se torna muito viscosa, comportando-se como fluido de Bingham, isto é, que não flui sobre a força do próprio peso, assim, é necessário trabalhar com menores concentrações de proteínas na solução formadora do filme.

As características estruturais e a composição química do biopolímero utilizado na elaboração dos biofilmes são muito importantes. Neste sentido as proteínas são mais interessantes que os polissacarídeos (homopolímeros), por possuírem em sua estrutura até 20 monômeros diferentes (aminoácidos), com alto potencial de interações intermoleculares (GONTARD; GUILBERT, 1996). Segundo Cuq (1996), as propriedades funcionais (força, deformação, barreira aos gases, etc.) dos biofilmes dependem, sobretudo, do tipo de ligações intermoleculares.

2.4.3. Plastificantes

Os plastificantes são definidos como substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade que, quando adicionados a outro material, provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas (McHUGH; KHOCHTA, 1994).

Caracterizam-se por um componente muito importante na composição dos biofilmes, pois é exigido para superar a fragilidade, melhorar a flexibilidade e extensibilidade dos biofilmes (FAMA et al., 2005). Ou seja, eles permitem a obtenção de biofilmes menos frágeis, mais flexíveis, mais suaves, e eventualmente mais duros e resistentes. A redução das forças intermoleculares entre as cadeias do polímero e em consequência da coesão do conjunto facilita a elongação e diminui sua temperatura de transição vítrea, porém, pelo contrário, faz com que diminuam as propriedades de barreira frente aos gases, vapores e solutos (GUILBERT; BIQUET, 1995; SANTOS; SANTOS et al., 2005).

Na realidade, os plastificantes influenciam todas as propriedades funcionais dos biofilmes, não só as propriedades mecânicas. A permeabilidade ao vapor de água tende a aumentar com o incremento do teor de plastificantes hidrofílicos, como é o caso dos polióis, em especial o glicerol. De acordo com McHugh; Krochta (1994), o aumento do teor de glicerol leva ao aumento, também, da permeabilidade aos gases de filmes hidrofílicos, ou seja, o glicerol se liga às moléculas do biopolímero, aumentando a mobilidade e diminuindo a densidade entre as suas moléculas, facilitando a transmissão dos gases através do material.

Os plastificantes devem ser compatíveis com o biopolímero e, geralmente, são adicionados na proporção de 10 a 60 g/ g matéria seca, dependendo do grau de rigidez do material (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1996).

Vários plastificantes vêm sendo utilizados na elaboração de biofilmes. Entre eles, podem ser encontrados mono, di e oligossacarídeos (glicose, sacarose), polióis (glicerol, sorbitol, derivados da glicerina e gliceróis), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactantes) (GUILBERT et al., 1996).

Em se tratando de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de peixe, os plastificantes mais comumente utilizados são os do tipo polióis como o sorbitol e o glicerol, capazes de garantir boa qualidade do filme biodegradável a ser produzido.

2.4.4. Tratamento térmico

A temperatura é um forte fator de desnaturação das proteínas, embora a estabilidade térmica e a conformação de cada proteína dependerão da composição do aminoácido. Proteína miofibrilar e proteína de soro de leite tem que ser termicamente desnaturada, a fim de formar uma matriz contínua (IWATA et al., 2000). Além disso, durante o período de secagem, quando a água é progressivamente eliminada, alteração de conformação da proteína e do grau de desdobramento da proteína determina o tipo e a proporção de ligações covalentes ou interação não covalente (hidrofóbico, ligações iônicas e hidrogênio) interações que podem ser estabelecidas entre as cadeias de proteínas. Sabe-se que as cadeias de proteína podem interagir mais fortemente e com facilidade, especialmente pelas pontes de dissulfeto, quando as proteínas são desnaturadas pelo calor. Assim, a coesão do produto final seria uma função destas ligações e determinará as propriedades dos filmes obtidos (DENAVI et al., 2009).

Paschoalick et al. (2003) relataram o efeito do teor de glicerol e o tratamento térmico sobre as propriedades funcionais dos biofilmes a base de proteínas de Tilápia do Nilo, verificando que o aumento da temperatura causou um aumento na permeabilidade ao vapor de água dos biofilmes, o tratamento térmico também provocou um ligeiro aumento na cor, possivelmente pela ocorrência de reação entre as moléculas de glicerol e o grupo reativo da lisina. Além disso, as propriedades mecânicas foram aumentadas com a elevação da temperatura.

O aquecimento modifica a estrutura tridimensional das proteínas globulares, causando exposição dos grupos SH dos resíduos da cistina, provocando a produção de pontes de enxofre (S-S) entre cadeias de proteínas adjacentes, e também promovendo a exposição de grupos funcionais que proporcionarão interações hidrofóbicas durante a secagem (PEREZ; GAGO; KROCHTA, 2001).

2.5. DOURADA (*Brachyplatystoma roussauxii*)

Peixe da ordem Siluriforme, família Pimelodidae, a dourada é um grande bagre (> 50 cm) que habita os canais dos principais rios da bacia amazônica e tem ampla distribuição na Amazônia. Sua estratégia de vida a coloca no grupo de estratégia de equilíbrio por apresentar (i) altos valores de tamanho e idade (ii) taxa de crescimento baixa (iii) alta sobrevivência de adultos (iv) mortalidade natural baixa (v) sua época de reprodução é cíclica, dura de dois a três meses durante a cheia de cada ano (vi) os ambientes utilizados pela espécie variam sazonalmente e (vii) seu mecanismo de dispersão e migração são amplos (ALONSO, 2002).

A dourada (Figura 2) possui grande porte, sendo o maior tamanho conhecido 192 cm. Suas principais características morfológicas são: a cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos. Diferencia-se das demais espécies do gênero *Brachyplatystoma* não só pela cor, mas também pelo tamanho dos barbilhões e pela mandíbula e maxilar do mesmo tamanho (FERREIRA et al., 1998).

Descrita em 1855 por Castelnau, e revisada taxonomicamente por Lundberg e Littman (2003), a dourada teve o seu nome específico mudado de *Brachyplatystoma flavicans* para *Brachyplatystoma rousseauxi*.



Figura 2: Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxi*)

Fonte: Batista, 2010

A dourada é uma das espécies mais importantes para a pesca comercial e artesanal na Amazônia, sendo capturada em seis países: Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela e Equador (BARTHEM; GULDING, 2007).

Segundo ao Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012) Com relação à produção continental por espécie, mostrou que no Brasil a dourada apresentou-se com volumes de desembarque em 2010 de 14.379 toneladas.

2.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

2.6.1. Planejamento fatorial fracionário

Segundo Dejaegher et al. (2009), os delineamentos fatoriais fracionados são frequentemente utilizados para identificar os fatores mais importantes durante a primeira fase do método de otimização.

Ao realizar experimentos industriais, é comum verificar a necessidade de estudar o efeito de um ou mais fatores de controle ao mesmo tempo (ABRAHAM et al., 1999). A aplicação das técnicas de planejamentos de experimentos fatoriais fracionados 2^{k-p} , mostra-se como uma das soluções para esse tipo de problema. Montgomery (2009) ressalta que, com essa técnica, é possível analisar os efeitos sobre uma resposta de interesse, de k fatores com dois níveis cada um, em 2^{k-p} combinações de testes, realizando-se apenas uma parte do experimento (metade do experimento) sem comprometer significativamente a precisão das conclusões decorrentes da análise de resultados. Simultaneamente, os custos e o tempo de duração dos ensaios são significativamente reduzidos.

Os planejamentos fatoriais 2^k , conforme Box, Hunter e Hunter (2005), possuem algumas vantagens, entre elas a capacidade de proporcionar uma análise simplificada e, também, serem a base de muitos outros planejamentos úteis, como os fatoriais

fracionados 2^{k-p} . Os experimentos fatoriais fracionados são úteis quando o objetivo é examinar um grande número de fatores para determinar quais podem ser os mais importantes, ou quando tempo ou recurso disponível para o experimento são escassos.

2.6.2. Planejamento fatorial completo

Os planejamentos fatoriais completos avaliam quantitativamente a influência das variáveis sobre a resposta de interesse, bem com suas possíveis interações. Quando o objetivo principal do pesquisador é otimizar o seu sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, utiliza-se a metodologia da superfície de resposta (BARROS NETO et al., 2001).

A metodologia de superfície de resposta foi amplamente e efetivamente utilizada em investigações industriais e outros processos para melhoria e/ou desenvolvimento nutricional de produtos devido a sua utilidade prática na otimização dos mesmos (DRAPER; LIN, 1990; FICHTATI et al., 1990; FLOROS; CHINNAN, 1988). Esta metodologia pressupõe o uso de planejamentos experimentais com o objetivo de investigar e estudar sobre a forma funcional dos processos ou sistemas que envolvem uma ou mais respostas que são influenciadas por vários fatores ou variáveis independentes (CORZO; GOMEZ, 2004). Um apropriado planejamento experimental é fundamental para habilitar um investigador a explorar o processo em estudo e encontrar através da otimização, o máximo ou o mínimo, se estes existirem, ou determinar a região, dentro do espaço total dos fatores, que seja a condição operacional desejável (MYERS, 1971).

A metodologia de superfície de resposta, do inglês Response Surface Methodology (RSM) é uma técnica de análise de processos baseada no emprego de planejamentos fatoriais, cujo principal atrativo é a redução do número de ensaios necessários para se avaliar a influência de determinadas variáveis na resposta em estudo, além de fornecer resultados melhores dos que os obtidos pela análise de uma variável tradicional, que além de necessitar uma maior quantidade de experimentos, não fornece as interações que podem existir entre as variáveis (BOX et al., 1978).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Matéria-Prima

Os resíduos (aparas da filetagem) do processamento da dourada (Figura 3) foram provenientes do processo de filetagem, da indústria de pesca Free Mar localizada no município de Vigia-Pa. As aparas foram embaladas em sacos de polietileno, armazenadas em caixa isotérmica com gelo escama e transportadas para o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) da Universidade Federal do Pará. No laboratório as aparas foram higienizadas com imersão em água clorada a 5 ppm (mg/L) por 5 minutos e lavadas com água destilada, em seguida o material foi prensado manualmente para retirada do excesso de água. As aparas foram trituradas em processador doméstico (Walita, RI7625), por 60 segundos e em seguida acondicionadas em sacos de polietileno, embaladas a vácuo e submetidas a congelamento a -26°C até as próximas etapas.



Figura 3: Resíduo da dourada

Fonte: Autora, 2013

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Composição centesimal e cor instrumental da matéria-prima

A composição centesimal do resíduo da dourada foi determinada através das análises:

- **Umidade:** realizada pelo método gravimétrico de acordo com o método 932.12 da AOAC (1997), por secagem em estufa a 105°C até peso constante;

- **Proteína bruta:** determinada através da determinação do nitrogênio total, pelo método de Kjeldahl e conversão em proteína, multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25, de acordo com o método 940.25 da AOAC (1997);
- **Lipídeos:** determinados pelo método Soxhlet, usando éter de petróleo como extrator, de acordo com o método 922.06 da AOAC (1997);
- **Cinzas:** determinadas pelo método gravimétrico, por calcinação, de acordo com o método 938.08 da AOAC (1997), em forno mufla a 550°C;
- **Cor instrumental:** determinada utilizando colorímetro MINOLTA modelo CR 310, obtendo-se parâmetros de L* (luminosidade), a* (intensidade do vermelho), b* (intensidade do amarelo), C* (valor do croma) e h* (ângulo de tonalidade).

3.2.2. Extração das proteínas miofibrilares

Para a obtenção das proteínas miofibrilares de peixe (PMP), foi utilizada a metodologia proposta por Zavareze et al. (2012). As aparas da dourada foram descongeladas sob refrigeração (7°C) e misturadas com três volumes de água destilada fria (5°C) utilizando homogeneizador (Tecnal, TE-102) por 2 minutos, em seguida o material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 2 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada (Thermo Fisher, Multifuge X1R) seguido por filtração, através de uma camada de tecido de faillet. O material retido foi misturado com 5 volumes de solução de Cloreto de Sódio 50 Mm (Synth PA-ACS) a 5°C por 5 minutos e submetido a filtração novamente, este processo foi repetido mais duas vezes e, após essa etapa, a pasta de proteínas miofibrilares assim obtida, foi distribuída em bandejas de aço inoxidável, congelada a -22°C e submetida à liofilização a -60°C por 48 horas (Liotop, L101), posteriormente a proteína liofilizada foi peneirada em peneira redonda de inox de Tyler 35 com abertura de 0,42 mm, obtendo-se as proteínas miofibrilares liofilizadas (PML), o material obtido foi mantido sob congelamento a -26°C até sua utilização na produção do biofilme.

Após a etapa de extração, realizou-se o cálculo do rendimento das proteínas miofibrilares, calculado através da relação entre a proteína final liofilizada e a quantidade inicial de matéria-prima, segundo a Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

3.2.3. Caracterização das proteínas miofibrilares liofilizadas

Os procedimentos para determinar composição centesimal e cor instrumental das proteínas miofibrilares liofilizadas foram realizados conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.3.1. Composição de aminoácidos

Para a determinação do perfil de aminoácidos totais da PML foi utilizado cromatógrafo líquido de alta performance Waters-PICO Tag™, Waters Model 712 WISP (Waters, Watford, Herts, UK), segundo o método proposto por White; Hart; Fry (1986).

3.2.3.2. Microestrutura

A microestrutura da superfície da amostra da proteína miofibrilar liofilizada foi determinada utilizando microscópio eletrônico de varredura - MEV (Leo-Zeiss, modelo 1430) utilizando as condições de análise: Tensão de aceleração de 10 kV, corrente do feixe de elétrons de 90 μ A e distância de trabalho de 15 mm para as imagens de elétrons secundários durante a obtenção das micrografias. Antes da visualização, a amostra foi fixada em suporte com fita adesiva dupla face, metalizada com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 minutos. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – LABMEV do Instituto de Geociências da UFPA.

3.2.4. Obtenção do biofilme

Os biofilmes foram obtidos de acordo com Zavareze et al.(2012) onde a produção consistiu primeiramente no preparo da solução formadora do biofilme (SFB) onde as proteínas miofibrilares em diferentes concentrações foram misturada com água destilada (p/v). O pH foi ajustado para 11 com hidróxido de sódio 2M (Cinética, NaOH-PA). Foi adicionado a esta mistura diferentes concentrações de plastificante (Isofar, Glicerina PA com 99,5% de pureza) de acordo com planejamento fracionário apresentado na Tabela 2.

A solução final foi homogeneizada a 10.000 rpm durante 5 minutos utilizando homogeneizador Turrtec (Tecnal, TE-102) em seguida a solução foi a banho-maria (TECNAL, TE-057) durante 30 minutos nas temperaturas de 50, 70 e 90°C, obtendo-se SFB.

Através do método *casting*, 120mL da solução formadora de biofilme foram colocadas em suporte de silicone no formato circular de 22cm de diâmetro por 3cm de

altura, sendo direcionados para secagem em estufa incubadora (Quimis, Q315M) nos tempos e temperaturas baseados no planejamento. Após a secagem, os biofilmes foram acondicionados em sacos de polietileno a temperatura ambiente (22°C), até serem analisados.

3.2.5. Determinação das variáveis no processo de obtenção do biofilme através do planejamento fracionário

Com base na literatura consultada (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000; HAMAGUCHI et al, 2007; LIMPAN et al, 2012; ZAVARE, et al., 2012; ARFAT et al, 2014) verificou-se que inúmeros fatores influenciam na obtenção do biofilme, porém jamais estudados simultaneamente. Desta forma foram realizados testes preliminares para definir as faixas desses fatores e as variáveis envolvidas no processo foram definidas.

As influências das seguintes variáveis independentes foram estudadas: concentração de proteína miofibrilar liofilizada, concentração de plastificante, temperatura do banho-maria, tempo e temperatura de secagem na obtenção do biofilme, tendo em vista, as variáveis dependentes analisadas: resistência à tração, porcentagem de alongação e permeabilidade ao vapor de água.

Neste estudo utilizou-se um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , com dois níveis (+1 e -1) e repetições no ponto central. O projeto fatorial completo 2^5 envolve 32 ensaios, os quais foram fracionados em dois, obtendo-se apenas 16 ensaios fatoriais e 3 pontos centrais, totalizando nesta etapa 19 ensaios. As Tabelas 1 e 2 mostram a definição dos níveis das cinco variáveis envolvidas no processo e a matriz do delineamento fracionário com seus valores codificados e reais respectivamente.

Tabela 1: Definição dos níveis das cinco variáveis estudadas na obtenção do biofilme

FATORES	-1	0	+1
PML (%) – X1	1	1,5	2
Plastificante (%) – X2	30	40	50
T banho-maria (°C) – X3	50	70	90
T secagem (°C) – X4	25	30	35
Tempo de secagem (h) – X5	16	20	24

Tabela 2: Planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) com valores codificados e reais

<i>CODIFICADO</i>						<i>REAL</i>				
<i>Ensaios</i>	<i>X1</i> (%)	<i>X2</i> (%)	<i>X3</i> (°C)	<i>X4</i> (°C)	<i>X5</i> (h)	<i>X1</i> (%)	<i>X2</i> (%)	<i>X3</i> (°C)	<i>X4</i> (°C)	<i>X5</i> (h)
1	-1	-1	-1	-1	1	1	30	50	25	24
2	1	-1	-1	-1	-1	2	30	50	25	16
3	-1	1	-1	-1	-1	1	50	50	25	16
4	1	1	-1	-1	1	2	50	50	25	24
5	-1	-1	1	-1	-1	1	30	90	25	16
6	1	-1	1	-1	1	2	30	90	25	24
7	-1	1	1	-1	1	1	50	90	25	24
8	1	1	1	-1	-1	2	50	90	25	16
9	-1	-1	-1	1	-1	1	30	50	35	16
10	1	-1	-1	1	1	2	30	50	35	24
11	-1	1	-1	1	1	1	50	50	35	24
12	1	1	-1	1	-1	2	50	50	35	16
13	-1	-1	1	1	1	1	30	90	35	24
14	1	-1	1	1	-1	2	30	90	35	16
15	-1	1	1	1	-1	1	50	90	35	16
16	1	1	1	1	1	2	50	90	35	24
17	0	0	0	0	0	1,5	40	70	30	20
18	0	0	0	0	0	1,5	40	70	30	20
19	0	0	0	0	0	1,5	40	70	30	20

Os resultados foram compilados em tabelas do programa Microsoft Office Excel (2007) e foram submetidos a tratamentos estatísticos utilizando-se o Programa Statistic for Windows versão 7.0 (2004) para determinar quais variáveis apresentaram influências significativas sobre as respostas.

Foram verificados através do erro puro quais variáveis apresentavam contraste estatisticamente significativo para cada resposta avaliada e após a exclusão dos contrastes não significativos, foram utilizados apenas os fatores significativos para a otimização do biofilme através do delineamento composto central rotacional.

3.2.6. Delineamento Composto Central Rotacional

Para estabelecer a melhor combinação proteína-plastificante (definida no planejamento anterior) no processo de obtenção do biofilme, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^2 , constituído por ensaios lineares nos níveis -1 e $+1$, ensaios com pontos axiais α e $-\alpha$, definidos em 1,41 e -1,41, respectivamente e repetições no ponto central. A definição dos níveis das variáveis estudadas está descrita na Tabela 3.

Foram realizados 12 experimentos (Tabela 4), sendo 4 ensaios fatoriais (combinação entre os níveis ± 1), 4 ensaios no ponto central (quatro variáveis no nível 0) e 4 ensaios nos níveis axiais $\pm \alpha$. Tendo como variáveis de entrada (independentes): a concentração de proteína miofibrilar liofilizada (X1) e concentração de plastificante (X2).

As variáveis dependentes estudadas foram: permeabilidade ao vapor de água e porcentagem de alongação, avaliadas conforme o item 3.2.7.

Tabela 3: Definição dos níveis das duas variáveis estudadas na obtenção do biofilme

FATORES	$-\alpha$ (-1,41)	-1	0	+1	$+\alpha$ (1,41)
PML (%) – X1	0,79	1	1,5	2	2,21
Plastificante (%) – X2	25,86	30	40	50	54,14

Tabela 4: Planejamento fatorial completo composto central rotacional (2^2) com valores codificados e reais

Ensaios	Codificado		Real	
	X1 (%)	X2 (%)	X1 (%)	X2 (%)
1	-1	-1	1	30
2	1	-1	2	30
3	-1	1	1	50
4	1	1	2	50
5	0	-1,41	1,5	25,86
6	0	1,41	1,5	54,14
7	-1,41	0	0,79	40
8	1,41	0	2,21	40
9	0	0	1,5	40
10	0	0	1,5	40
11	0	0	1,5	40
12	0	0	1,5	40

* X1= Concentração de proteínas; X2 = Concentração de plastificante

Para a análise dos resultados experimentais, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta para verificar o comportamento do sistema no qual estão combinadas as variáveis independentes e as variáveis dependentes (respostas). Assim, após a exclusão dos efeitos não significativos, se obteve as equações e gráficos de influência dos fatores (Proteína / Plastificante) sobre as variações de PVA e porcentagem de alongação. Com os dados, foi estabelecida a concentração de proteína

miofibrilar e a concentração de plastificante ótima do processo de obtenção do biofilme.

3.2.7. Caracterização do biofilme

3.2.7.1. Espessura do biofilme

A espessura do biofilme foi medida utilizando-se um micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, modelo IP54). Foram selecionados oito locais aleatórios em torno de cada biofilme obedecendo a um afastamento da borda de 60 mm para a determinação da espessura.

3.2.7.2. Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e porcentagem de alongamento na ruptura (E) dos biofilmes foram determinadas empregando-se metodologia ASTM D882-91 (ASTM, 1996) utilizando texturômetro (QTS, Brookfield).

As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (23°C). A separação inicial das garras e a velocidade da probe foram de 50 mm e 1 mm.s⁻¹, respectivamente de acordo com metodologia descrita por Zavareze 2012. As amostras foram cortadas em tiras de 100 mm de comprimento e 25 mm de largura. A resistência à tração (RT) e a porcentagem de alongação (E) foram calculadas pelas Equações 2 e 3, respectivamente.

$$RT = \frac{Fm}{A} \quad \text{Equação (2)}$$

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

$$E = \frac{d_T}{d_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: E: alongação (%); d_T: distância total no momento da ruptura (mm); d_{inicial}: distância inicial de separação das garras (50 mm).

3.2.7.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada utilizando-se o método modificado ASTM D882-95 descrito por Arfat et al.(2014).

A amostra do biofilme foi selada com adesivo de silicone na abertura circular de um recipiente de vidro de 4,5 cm de diâmetro e 7,0 cm de altura contendo 10 g de sílica gel a 0% UR; 0 Pa de pressão de vapor de água a 30°C. Estes recipientes de

permeação foram colocados em dessecadores contendo água destilada a 30°C a 99% UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor de água a 30°C. Foram pesados em intervalos de 1h por um período de 10 horas. A PVA foi calculada através da Equação 4.

$$PVA = \frac{W \cdot X}{A \cdot t \cdot \Delta P} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: PVA: permeabilidade ao vapor de água (g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹.); W: ganho de peso pelo dessecante (g); X: espessura do filme (m); A: área da superfície do biofilme exposto (m²) t: tempo de incubação (segundos); ΔP: diferença de pressão parcial (Pa). Três corpos de provas foram usados para testes de PVA.

3.2.7.4. Solubilidade do biofilme

Para determinação da solubilidade, os filmes foram recortados em discos de 2 cm de diâmetro e determinou-se a matéria seca inicial em estufa a 105°C por 24 horas. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipientes contendo 50 mL de água. O sistema foi agitado em Incubadora Shaker refrigerada (Cielanb, modelo CE-725B) com velocidade de 150 rpm por um período de 24 horas, a 25°C. Após este período, as amostras foram removidas e secas (105°C por 24 horas), para determinar a matéria seca não dissolvida em água (GONTARD et al., 1994).

3.2.7.5. Transmissão de luz e Transparência

A transmitância de luz dos biofilmes foi medida na faixa do ultravioleta e do visível (200 e 800 nm). Os corpos de prova foram cortados em retângulos e colocados no lado interno da cubeta. A transparência dos biofilmes foi determinada em triplicata, os dois parâmetros foram quantificados usando um espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22). A transparência foi determinada a 600 nm por meio da Equação 5, de acordo com o método ASTM D1746 descrito por Arfat et al., 2014.

$$Transparência = \frac{\log \%T}{e} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: T = transmitância a 600 nm; e = espessura do biofilme (mm).

3.2.7.6. Cor

A cor do biofilme foi determinada utilizando colorímetro MINOLTA modelo CR 310, obtendo-se parâmetros de L* (luminosidade), a* (intensidade do vermelho), b* (intensidade do amarelo), C* (valor do croma), h* (ângulo de

tonalidade) e a diferença total de cor (ΔE^*) calculado de acordo com a equação 6.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde: Δ é a diferença dos parâmetros de cor da amostra do biofilme em relação ao padrão branco (L: 95,59; a: -5,56; b: 8,16)

3.2.7.7. Caracterização microscópica da superfície e secção transversal do biofilme

A microestrutura da superfície superior e da secção transversal do biofilme foi determinada utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Leo-Zeiss, modelo 1430), conforme descrito no item 3.2.3.4.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises físicas, mecânicas, barreira e centesimais foram avaliados com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2007. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT Inc., 2004) através da avaliação dos contrastes para o planejamento fracionário e da hierarquização dos efeitos, análise de variância e análise de superfície de resposta para o delineamento composto central rotacional.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO E DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS

4.1.1. Caracterização física e centesimal do resíduo e das proteínas miofibrilares liofilizadas

Os resultados da composição física e físico-química do resíduo e das proteínas miofibrilares estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Composição física e físico-química do resíduo e das proteínas miofibrilares

Determinações	Resíduo ¹	PML ²
Proteínas	81,72 ± 0,484	96,58 ± 0,319
Cinzas	10,07 ± 0,070	2,86±0,054
Lipídeos	8,61 ± 0,253	0,74±0,018
Umidade	3,32 ± 0,041	0,06 ± 0,0002
Rendimento	—	24,44%
Parâmetros de cor		
L*	45,82± 0,197	87,81 ±0,131
a*	-2,14 ± 0,173	-2,247 ±0,059
b*	2,8167 ± 0,068	15,587 ± 0,120
h*	43,39 ± 0,122	98,207 ± 0,199
C*	3,542 ± 0,102	15,747 ± 0,119

^{1,2} Representam a média das triplicatas ± desvio-padrão do resíduo da dourada e Proteína Miofibrilar Liofilizada (PML) em base seca; L* = Luminosidade; a* = verde-vermelho; b* = azul-amarelo; c* = croma; h* = ângulo de tonalidade.

O resultado das PML (Tabela 5) pode ser comparado com os resultados encontrados por Arthan et al. (2007) de 81,84 %, Cortez-Vega et al. (2013) de 92,37% e Zavareze et al. (2013) de 90,36 %, para proteínas miofibrilares das espécies corvina (*Micropogonias furnieri*), carapau rodada (*Decapterus maruadsi*) e corvina, respectivamente. Apesar de serem espécies diferentes a comparação pode ser realizada levando em consideração a formação de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. Sabe-se que a composição centesimal de peixes pode apresentar ampla variação em função da alimentação, sexo, condição nutricional, parte do músculo analisada, época e local de pesca. O resultado encontrado indica que a dourada apresenta elevada concentração de proteína miofibrilar (96,58%) importante para a formação da matriz biopolimérica.

Ao comparar o conteúdo de lipídeos do resíduo e da proteína extraída (PML) é possível verificar que há uma redução drástica neste valor após a extração. Esta quantidade está relacionada com a eficiência da extração, uma vez que na retirada das

proteínas solúveis uma grande quantidade de gorduras também é eliminada, principalmente na etapa de centrifugação. Segundo Faustman et al. (2010), a remoção dos lipídeos favorece a interação entre moléculas de proteína, resultando no aumento da rigidez do filme. Além de contribuir significativamente para a redução da oxidação lipídica, aumentando assim a estabilidade do produto.

A cor não interfere nas propriedades funcionais das proteínas, no entanto dependendo da cor da matéria-prima, pode influenciar a tonalidade do biofilme produzido. A análise de cor das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML) foi de 87,82 para o parâmetro L^* apresentando uma coloração clara, pois valores de L^* abaixo de 50 representam cores escuras. Os parâmetros a^* e b^* apresentaram-se próximos de zero, demonstrando que esses eixos têm pouca influência na formação da cor da proteína estudada.

Ao comparar os parâmetros de cor do resíduo de dourada com a PML observa-se que o processo de extração melhorou a coloração desta última de acordo com os valores encontrados para L^* , a^* , b^* , h^* e C^* (Tabela 5).

O valor de croma (C^*) está relacionado diretamente à concentração de cor, onde valores próximos de zero significam coloração cinzenta, neste estudo o C^* foi de 15,75. O ângulo de tonalidade (h^*) define tonalidade em si, e, no caso de ser negativo, apresenta uma tendência à coloração escura (CHEOW et al., 2007; HUNTERLAB, 2012). Na presente pesquisa a tonalidade encontrada foi de 98,20 para a PML. A combinação dos eixos L^* , a^* , b^* correspondeu de forma adequada à cor perceptível da proteína miofibrilar liofilizada de dourada com aparência esbranquiçada e sem tendência à coloração cinza. Estes resultados são importantes para o desenvolvimento da presente pesquisa, pois biofilmes aceitáveis são os mais transparentes possíveis.

Comparando os parâmetros de cor entre a amostra analisada de resíduo de dourada e a proteína miofibrilar liofilizada é possível observar que extração proporcionou melhor coloração conforme os valores encontrados para L^* , a^* , b^* , h^* e C^* mostrando que o processo de lavagem influenciou em PML mais clara pela eliminação de sangue e outros pigmentos.

O rendimento após o processo de extração foi influenciado pela eficiência da retirada de proteínas solúveis como as sarcoplasmáticas, neste estudo, o rendimento médio após o processo de extração das proteínas miofibrilares liofilizadas foi de 24,44%.

4.1.2. Perfil de aminoácidos das proteínas miofibrilares

O perfil de aminoácidos da proteína miofibrilar liofilizada estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Perfil de aminoácidos da proteína miofibrilar liofilizada da dourada (g/100g de proteína)

Aminoácido	Símbolo	Resultado (%)
Aspartato	ASP	9,81
Ácido glutâmico	GLU	15,79
Hidroxiprolina	HPRO	0,00
Serina	SER	3,49
Glicina	GLY	3,35
Histidina	HYS	1,58
Taurina	TAU	0,12
Arginina	ARG	6,36
Treonina	THR	4,62
Alanina	ALA	5,29
Prolina	PRO	3,17
Tirosina	TYR	3,44
Valina	VAL	4,85
Metionina	MET	3,09
Cisteína	CYS	0,55
Isoleucina	ILE	4,56
Leucina	LEU	7,95
Felilalanina	PHE	3,77
Lisina	LIS	9,34
Total	-	91,13

Os aminoácidos encontrados em maior quantidade foram os ácidos glutâmico e aspártico, arginina, lisina e leucina. A baixa concentração de cisteína e de taurina encontrada nesta pesquisa é devida à baixa concentração de pontes dissulfetos (-S-S) segundo Monterrey-Quintero; Sobral (2000). A cisteína, apesar de classificada como polar não ionizável, pode interagir com outras moléculas de cisteína, via pontes dissulfeto (-SS-), formadas a partir do grupo tiol (-SH), se transformando em cistina. Nessa situação, a interação que ocorre é a ligação covalente (SUZUKI; SOBRAL; MENEGALLI, 2004).

A ausência de hidroxiprolina deve-se à sua degradação durante a hidrólise ácida a que foi submetida à amostra para a análise. A quantificação do triptofano não foi realizada é devida devido à metodologia empregada.

Os resultados mostram que a PML apresenta conteúdo dos aminoácidos sulfurados, cisteína e metionina. Também foram encontrados aminoácidos ionizáveis:

ácido aspártico, ácido glutâmico e arginina; os aminoácidos não ionizáveis serina e treonina, representando 40% do total do conteúdo de aminoácidos. Assim, a possibilidade de interações do glicerol na matriz da proteína, tal como ponte de hidrogênio pode ser considerada alta.

O perfil de aminoácido assume grande destaque, pois as características estruturais e a composição química da proteína utilizada na elaboração dos biofilmes são muito importantes. As proteínas possuem em sua estrutura até 20 monômeros diferentes (aminoácidos), com alto potencial de interações intermoleculares (GONTARD; GUILBERT, 1996). Segundo Cuq (1996), as propriedades funcionais (força, deformação, barreira aos gases, etc.) dos biofilmes dependem, sobretudo, do tipo de ligações intermoleculares.

Segundo CUQ 1996, a composição de aminoácidos das proteínas, determina os tipos e quantidades de interações entre as cadeias laterais e, entre essas e a água. Algumas dessas interações são produzidas pelos aminoácidos com grupos polares ionizáveis (Lys, His, Arg, Trp, Pro) e polares não ionizáveis (Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys), que se ligam à água, via pontes de hidrogênio. Outras interações, as hidrofóbicas, podem ser formadas pela aproximação de cadeias laterais constituídas de aminoácidos com grupos hidrofóbicos (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro).

Foi possível observar que dos 19 aminoácidos quantificados 13% são hidrofílicos e 65% hidrofóbicos, estes resultados assumem importância nas propriedades de biofilmes, principalmente na solubilidade e na permeabilidade ao vapor de água. O grau de hidrofilicidade do resíduo de aminoácido da proteína controla a influência da umidade na propriedade de transporte de massa do filme, tornando filmes de proteína em excelente barreira para substâncias não polares, tal como o oxigênio (KROCHTA, 1997). As moléculas de proteínas são interessantes, uma vez que podem formar filmes resistentes à água, que dependerá da composição de aminoácidos presentes na estrutura.

Segundo Dangaran et al. (2009) as propriedades inerentes as proteínas as tornam excelentes materiais para produção de biofilmes biodegradáveis, uma vez que, a distribuição de aminoácidos polares e não polares ao longo da cadeia de proteína cria potencial químico resultando em forças capazes de produzir uma matriz coesa no biofilme.

4.1.3. Caracterização da microestrutura matéria prima

As micrografias das proteínas miofibrilares do resíduo da dourada podem ser visualizadas na Figura 4.

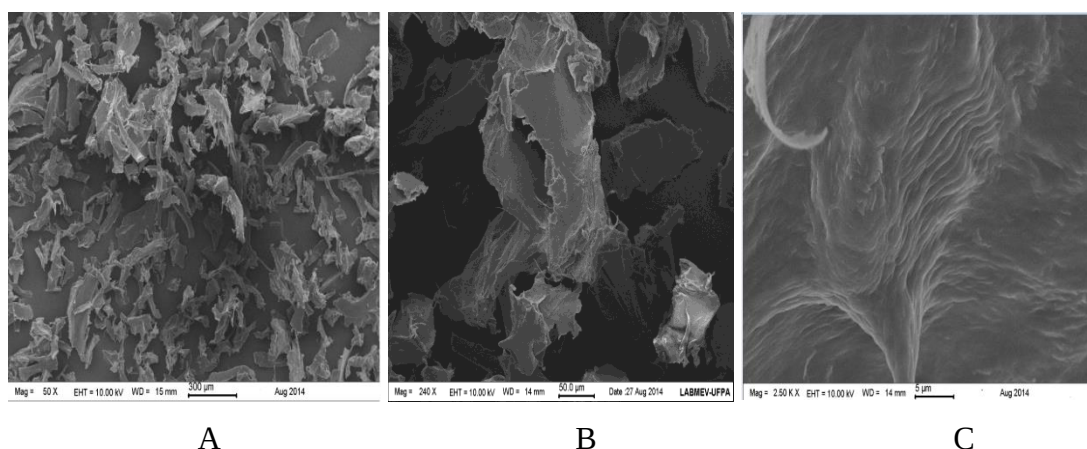


Figura 4: Microfotografias das proteínas miofibrilares liofilizadas: A (50 X), B (240 X) e C (2500 X).

Segundo os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as proteínas miofibrilares liofilizadas aparecem como um conjunto desordenado de partículas de tamanhos diferentes. Na estrutura morfológica de 2400 X, pode observar-se a presença de partículas sistematicamente distribuídas, característica de moléculas de proteínas mostrado na Figura B.

Álvarez-Parrilla; Lluch (1997) verificaram, através da microscopia, que proteínas extraídas pelo método de surimi apresentaram estrutura típica do músculo de pescado caracterizando como uma estrutura reticular proteica com alvéolos maiores, podendo-se distinguir regiões de alta e baixa densidade proteica e esporadicamente com algum fragmento de fibra muscular. Resultados estes semelhantes aos obtidos neste estudo, verificado na imagem B onde a parte clara representa proteínas de alta densidade como actina e miosina e a parte escura em menor proporção como proteínas de baixa densidade como a troponina T ou fragmentos de cadeias leves, confirmando que a extração das proteínas miofibrilares da dourada foi eficiente para demonstrar o comportamento visual microscópico da matriz polimérica.

Contudo, as microfotografias da superfície revelaram uma estrutura externa pouco homogênea, apesar de coesa e densa. Essa heterogeneidade se deve provavelmente, aos canais formados no interior da estrutura quando houve saída da água durante a liofilização.

4.2. DETERMINAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO BIOFILME

A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento experimental fracionário com os respectivos níveis e as respostas, onde X_1 : proteína miofibrilar liofilizada; X_2 : plastificante; X_3 : temperatura do banho-maria; X_4 : temperatura de secagem; X_5 : tempo de secagem; PVA: permeabilidade de vapor de água em triplicata; RA: resistência a tração em sextuplicatas; E: porcentagem de elongação em sextuplicatas.

Tabela 7: Delineamento fracionário das variáveis independentes com suas respectivas respostas

<i>CODIFICADO</i>						<i>RESPOSTAS</i>		
<i>Ensaios</i>	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	<i>PVA*</i>	<i>RT*</i>	<i>E*</i>
1	-1	-1	-1	-1	+1	7,34	4,375	167,617
2	+1	-1	-1	-1	-1	13,5	6,345	113,820
3	-1	+1	-1	-1	-1	7,6	2,643	147,897
4	+1	+1	-1	-1	+1	12,7	5,079	105,010
5	-1	-1	+1	-1	-1	5,96	4,806	156,010
6	+1	-1	+1	-1	+1	12,4	9,044	99,247
7	-1	+1	+1	-1	+1	6,23	3,619	159,050
8	+1	+1	+1	-1	-1	15,3	5,367	110,240
9	-1	-1	-1	+1	-1	6,91	5,839	195,420
10	+1	-1	-1	+1	+1	11,6	9,051	92,487
11	-1	+1	-1	+1	+1	10,7	4,340	189,853
12	+1	+1	-1	+1	-1	14,3	6,312	97,487
13	-1	-1	+1	+1	+1	5,66	5,229	160,480
14	+1	-1	+1	+1	+1	15,3	9,475	95,907
15	-1	+1	+1	+1	-1	9,14	4,409	166,480
16	+1	+1	+1	+1	+1	11,5	6,025	90,913
17	0	0	0	0	0	8,56	6,194	139,553
18	0	0	0	0	0	7,01	7,305	134,050
19	0	0	0	0	0	7,51	6,112	130,033

*PVA: $[x10^{-11}(\text{g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1})]$; RT: MPa; E: %.

O contraste estimado, coeficiente t e significância estatística (p) para cada fator do biofilme em relação às respostas permeabilidade ao vapor de água, resistência a tração e porcentagem de elongação, obtido após o processo de produção podem ser visualizados nas Tabelas 8, 9 e 10. Esses valores foram determinados através Erro puro e optou-se em definir como variáveis significativas apenas àquelas que apresentaram significância a $p \leq 0,05$. Os fatores em negrito indicam que a variável apresentou contraste significativo sobre as respostas PVA, RT e E com 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Tabela 8: Contrastes estimados das variáveis, coeficiente t e significância estatística, no delineamento fracionário para permeabilidade ao vapor de água

<i>VARIÁVEIS</i>	<i>Contrastes</i>	<i>Erro Puro*</i>	<i>T</i>
PML	5,88x10⁻¹¹	0,004446	14,94649
Plastificante	1,09x10 ⁻¹¹	0,109396	2,76948
T banho-maria	-3,97x10 ⁻¹¹	0,419707	-1,00767
T secagem	5,14x10 ⁻¹²	0,322020	1,30436
Tempo de secagem	-1,23x10 ⁻¹¹	0,089441	-3,11512

*Valor de $p \leq 0,05$

Na Tabela 8 é possível observar que a única variável que apresentou contraste significativo através do Erro Puro para a permeabilidade ao vapor de água foi à concentração de proteínas (X1), exercendo maior influencia, confirmando o comportamento dos dados, uma vez que, ao passar do nível mais baixo (-1) para o maior nível (+1) ocorre um aumento em PVA.

Na Tabela 7 os ensaios que apresentaram melhores resultados foram 5 e 13 (5,96 e 5,66x10⁻¹¹ g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹), respectivamente que correspondem as menores concentrações de proteínas (1%). Resultados semelhantes foram encontrados por Arfat et al. (2014) trabalhando com proteínas miofibrilares misturadas com gelatina onde obtiveram valores que variaram de 2,64 a 5,34x10⁻¹¹ g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹.

O aumento da concentração de PML implica no acréscimo de teor de sólidos formados nos biofilmes tornando-os mais permeáveis, o que está de acordo com Limpan et al. (2010), pois relataram que os filmes de proteínas de peixe têm alta absorção de água por causa da hidrofiliabilidade dos aminoácidos nas moléculas de proteína e significativa quantidades de plastificantes hidrófilicos, tais como glicerol, contribui para o aumento da permeabilidade ao vapor de água em biofilme a base de proteínas de peixe.

Para se obter melhores resultados de PVA é interessante trabalhar com concentrações baixas de proteínas miofibrilares de dourada.

Tabela 9: Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e significância estatística, no delineamento fracionário para resistência á tração

VARIÁVEIS	Contrates	Erro Puro*	t
PML	2,67988	0,015126	8,03846
Plastificante	-2,04612	0,025535	-6,13745
T banho-maria	0,49866	0,273361	1,49577
T secagem	1,17504	0,071921	3,52460
Tempo de secagem	0,19591	0,616283	0,58764

*Valor de $p \leq 0,05$

Na Tabela 9 verifica-se que a variável concentração de proteína miofibrilar (X1) apresentou contraste significativo levando em consideração o erro puro. Relacionando essa significância com o comportamento dos dados apresentados na Tabela 7 é possível observar que ao aumentar a concentração de PML ocorre aumento da resistência á tração, demonstrando-se a resistência do biofilme, o que pode garantir a integridade ao serem utilizados como embalagem. Resultados semelhantes foram encontrados por Zavareze et al., (2012) em que a resistência à tração dos filmes aumentou à medida que a concentração de proteínas miofibrilar foi elevada. O ensaio 14 foi o que obteve maior valor de resistência á tração (9,47 MPa), onde X₁ encontra-se no nível mais alto (+1) com 2% de proteína miofibrilar liofilizada

No entanto para a mesma variável dependente (RT), a concentração de plastificante (X2) também apresentou contraste significativo (Tabela 9), porém ao relacionar com os resultados mostrados na Tabela 7 é possível analisar o comportamento dos dados onde o aumento da concentração de plastificante, implica na diminuição da RT do biofilme, tornando-o menos resistente. A redução da resistência á tração com o aumento da concentração de glicerol é comportamento típico dos filmes à base de biopolímeros (GONTARD et al., 1994; SOBRAL et al., 1998; MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

Hamaguchi et al. (2007) ao utilizar 50% de plastificante (glicerol) encontraram 2,98 MPa para resistência a tração em filmes de proteínas miofibrilares de peixe Blue marlin (*Makaira mazara*), resultados menores que os encontrados neste estudo. A presença de plastificantes diminui a densidade das interações proteína-proteína aumentando a mobilidade das cadeias polipeptídicas e tornando os filmes menos resistentes e mais deformáveis (Cuq, 1996).

Os fatores temperatura do banho-maria, temperatura e tempo de secagem (X3, X4 e X5) não apresentaram contrastes significativos ($p \leq 0,05$) para a resposta resistência á tração.

Tabela 10: Contrastes estimados das variáveis, coeficiente t e significância estatística, no delineamento fracionário para % Elongação

<i>VARIÁVEIS</i>	<i>Contrastes</i>	<i>Erro Puro*</i>	<i>t</i>
PML	-67,2121	0,001262	-28,1263
Plastificante	-1,7571	0,538698	-0,7353
T banho-maria	-8,9079	0,065024	-3,7277
T secagem	3,7671	0,255636	1,5764
Tempo de secagem	-2,3254	0,433136	-0,9731

*Valor de $p \leq 0,05$

Na Tabela 10 apenas a variável concentração de proteína miofibrilar liofilizada (X1) apresenta contraste significativo ($p \leq 0,05$) em relação à porcentagem de alongação para o Erro Puro, pode se afirmar através dos resultados obtidos na Tabela 7, que um aumento de X1 promove uma redução na porcentagem de alongação apresentando biofilmes menos elásticos. Neste estudo foi visto que o ensaio 9 apresentou maior percentual de alongação de 195,42% exibido no nível baixo de X1 (1%), portanto, o ideal é trabalhar com menores concentrações de proteínas para se obter biofilmes com melhores alongações.

Os biofilmes produzidos com maiores concentrações de PML, apresentaram-se um visual ligeiramente grosseiro, que pode ser explicado em virtude das proteínas do músculo de peixe, quando solubilizadas pelo aumento do pH (11), produzirem soluções coloidais extremamente viscosas. Assim, é necessário trabalhar com menores concentrações de proteínas na solução formadora do biofilme.

Verifica-se também que a concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML) em relação ao valor de t é a que apresenta maior efeito numericamente (28,13), quando comparada com as demais variáveis sobre a resposta porcentagem de alongação.

As variáveis que não mostraram contraste significativo sobre as respostas foram fixadas em função do menor tempo e custo para o processo, ou seja, nos menores níveis, por tanto, a temperatura do banho-maria foi ajustada para 50°C, o tempo de secagem definido em 16 horas e a temperatura em 25°C.

Apesar do planejamento fatorial fracionário de dois níveis confundir os efeitos principais com efeitos de interação entre quatro variáveis, a triagem mostrou que os

resultados obtidos tiveram uma boa aproximação, uma vez que foi possível identificar as variáveis que exerceram maior influência sobre as respostas. Ressaltando que o planejamento utilizado neste trabalho é de resolução máxima 2_v^{5-1} .

As Tabelas 8, 9 e 10 mostraram que as variáveis independentes significativas foram: a concentração de proteína miofibrilar liofilizada (X1) e concentração de plastificante (X2) para as respostas em estudo.

4.3. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO

Após a eliminação dos parâmetros com efeitos não significativos do planejamento fracionário, verificou-se que as variáveis que realmente influenciam ao nível de significância de 95% ao relacionar com as respostas PVA, RT e E são: a concentração de proteína miofibrilar e concentração de plastificante.

Então foi realizado um planejamento fatorial completo com esses dois fatores, onde se estudou a influência das variáveis independentes significativas (X1 e X2) sobre as respostas permeabilidade ao vapor de água e porcentagem de alongação. A definição das condições ótimas do processo de obtenção do biofilme foi realizada através da metodologia de superfície de resposta.

O efeito estimado indica o quanto cada fator influencia nas respostas estudadas, quanto maior é o seu valor, maior é a sua influência, e um efeito positivo indica que ao passar de um valor mínimo a um máximo da variável, a resposta aumenta. Já um efeito negativo indica o contrário, ou seja, ao passar de um valor mínimo para o valor máximo, a resposta diminui.

O valor t indica o quão grande é a variável em relação ao seu desvio. Assim quanto maior o valor de t, maior é a probabilidade da variável ser estatisticamente significativa.

O valor do coeficiente p está ao nível de significância da variável independente sobre a resposta em estudo. Normalmente é escolhido como intervalo de confiança, o valor de 95%. Sendo assim, pode-se afirmar que, para valores de p inferiores 0,05, a variável é considerada estatisticamente significativa.

Na tabela 11 estão apresentados os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e porcentagem de alongação (E), obtidos experimentalmente do processo de obtenção de biofilme de peixe através do planejamento fatorial completo.

Tabela 11: Resultados experimentais para otimização de biofilme

Ensaio	Valores codificados		Variáveis Dependentes	
	X1	X2	PVA	E
01	-1	-1	6,338	136,023
02	1	-1	13,03	125,359
03	-1	1	6,703	165,432
04	1	1	12,42	158,178
05	0	-1,41	9,876	103,876
06	0	1,41	9,477	147,274
07	-1,41	0	6,5009	172,123
08	1,41	0	14,54	153,912
09 (C)	0	0	8,222	134,837
10 (C)	0	0	7,824	130,600
11 (C)	0	0	8,117	133,000
12 (C)	0	0	8,029	135,780

X1: Concentração de proteínas miofibrilares (%); X2: Concentração de plastificante (%);

PVA: Permeabilidade ao vapor de água (g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹); E: Elongação (%).

4.3.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Quando se avalia a PVA, os resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados (Tabela 11) apresentaram valores máximo e mínimo de $14,54 \times 10^{-11}$ e $6,34 \times 10^{-11}$ g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹.

Os resultados da análise estatística, aplicada aos dados experimentais de PVA, foram determinados através do erro puro e pela soma quadrática residual e são representados nas Tabelas 12 e 13 (Apêndice A) respectivamente. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e de interação, em negrito, são significativos com 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Como podem ser observados nas Tabelas 12 e 13, os fatores significativos foram os mesmos, tanto levando em consideração tanto o erro puro como o SS residual.

Na Tabela 11 os ensaios que apresentaram melhores resultados foram 1 e 7 ($6,34 \times 10^{-11}$ e $6,50 \times 10^{-11}$), respectivamente que correspondem as menores concentrações de proteínas nos níveis -1 e - α (1% e 0,8%), por tanto dependendo do objetivo da aplicação do biofilme o ideal é trabalhar com menores concentrações de proteínas e plastificante. Resultados semelhantes foram encontrados por Limpam et al. (2012) trabalhando com proteínas miofibrilares de peixe na obtenção de biofilmes onde obtiveram valores que variaram de $6,83 \times 10^{-11}$ a $11,88 \times 10^{-11}$ g.s⁻¹.m⁻².Pa⁻¹.

Verifica-se também que a concentração de proteínas (PML) Linear e Quadrática é o fator que apresenta maior efeito sobre a permeabilidade ao vapor de água.

De acordo com Matta et al., (2011), as propriedades de barreira dos filmes dependem da temperatura e da umidade relativa do ambiente, das características do biopolímero e da interação entre o polímero e o permeante, associada à polaridade. Dentre as características mais importantes do filme relacionadas à permeação, estão a espessura, a estrutura química do biopolímero e sua morfologia, a energia de coesão e o espaço livre entre as macromoléculas. Os biofilmes elaborados com maior concentração de proteínas (2%) apresentaram maior permeabilidade ao vapor de água em comparação aos biofilmes com menores concentrações de PML (Tabela 11). Este aumento pode estar relacionado com a maior concentração de proteínas nos filmes, pois, segundo Di Pierro et al. (2006), a permeabilidade ao vapor de água dos filmes aumenta com quantidades crescentes de proteínas, estando diretamente relacionada com o número de grupos polares (grupos laterais dos aminoácidos polares) disponíveis nas cadeias proteicas ($-OH$, $-COOH$ e $-NH_2$).

Após a eliminação dos parâmetros com efeitos não significativos, verificou-se através da análise de variância (ANOVA) a significância da regressão e da falta de ajuste com 95% de confiança ($p \leq 0,05$), utilizando o teste F, para o planejamento estudado, conforme a Tabela 14.

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para PVA, referente à otimização de biofilme

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado ($p \leq 0,05$)	R ²
Regressão	80,1362	3	26,7121	210,04	9,27	0,9875
Resíduo	1,0174	8	0,1272			
Falta de ajuste	0,9318	5	0,1864	6,53	9,01	
Erro puro	0,0856	3	0,0285			
Total	81,1536	11				

SQ: soma quadrática GL: grau de liberdade MQ: média quadrática

O modelo codificado proposto para representar o comportamento da PVA na obtenção de biofilme é:

$$PVA \text{ (g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}) = 8,05 + 2,98X_1 + 1,12X_1^2 + 0,69X_2^2 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

X1: Concentração de proteína miofibrilar liofilizada (%)

X2: Concentração de plastificante Glicerol (%)

A análise de variância (Tabela 14) mostrou que o modelo ajustado para a PVA (Equação 7) foi significativo com 95% de confiança e também preditivo, satisfazendo o critério sugerido por Box e Wetz (1973) visto que o F calculado foi 22,66 vezes maior que o F tabelado. A falta de ajuste não foi significativa no mesmo nível de confiança. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,99, indicando que o modelo explicou 99% da variação dos dados observados.

Na figura 5 são apresentadas a superfície de resposta e a curva de níveis gerada através do modelo proposto, considerando-se os pontos médios das concentrações de proteína miofibrilar (PML) e plastificante. Estas superfícies confirmam a análise dos efeitos realizada anteriormente e permitem visualizar a variação da resposta para cada ensaio estudado.

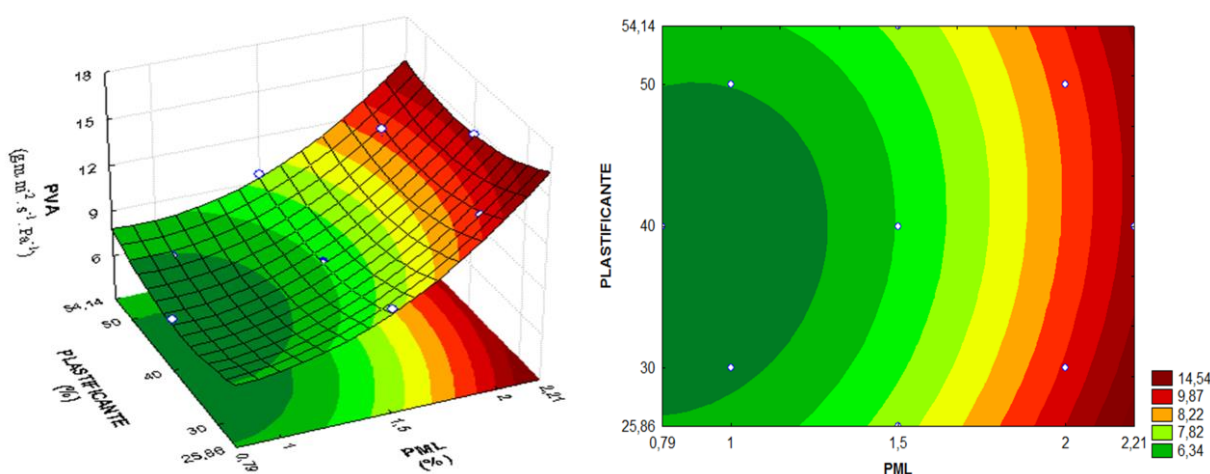


Figura 5: Superfície de resposta e curvas de nível para PVA, relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (%) e concentração de plastificante (%) na obtenção de biofilme.

É possível observar através da Figura 5 um aumento da permeabilidade ao vapor de água com a elevação da concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML) que pode ser evidenciada por meio das curvas de nível confirmando efeito positivo para este fator.

Verifica-se também, a concentração de plastificante favorece o aumento de PVA, este fenômeno pode ser explicado pelos autores MONTERREY- QUINTERO;

SOBRAI, 1999 e CHIRITA, (2008) em que o glicerol utilizado como plastificante é um componente hidrofílico que quando incorporado a essa rede de proteína, coloca-se entre os peptídeos, reduzindo a proximidade entre as cadeias de proteínas e, conseqüentemente, facilitando a mobilidade molecular, intensificando a afinidade pela água e aumentando a permeabilidade ao vapor de água.

Na Figura 6 (Apêndice A) é apresentado o gráfico de barras dos valores dos efeitos significativos sobre PVA. Verifica-se também que para todos os parâmetros significativos apresentam efeito positivo, ou seja, um aumento na concentração desses fatores acarreta um aumento na permeabilidade ao vapor de água, tornando o biofilme mais permeável.

Na região do nível mais baixo (-1) apresenta menor permeabilidade ao vapor de água ao contrário do nível mais alto (+1). Dentro do que foi obtido experimentalmente, a menor permeabilidade encontrada neste trabalho foi de $6,33 \times 10^{-11} \text{ g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$, por tanto, as regiões com melhores resultados de PVA são as de combinações 1% PML/30% Plastificante e 0,8% PML; 40% plastificante.

4.3.2. Elongação (E)

Os resultados de porcentagem de elongação, encontrados neste estudo, variaram entre 126,35% a 170,67% (Tabela 12).

Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e das interações na elongação, no processo de obtenção de biofilme, o coeficiente t e a significância estatística podem ser observados nas Tabelas 15 e 16 (Apêndice A), calculados pelo erro puro e SS residual, respectivamente. Os valores em negrito são significativos com 95% de confiança.

Verifica-se, através das Tabelas 15 e 16, que para a resposta porcentagem de elongação (E%) os fatores significativos com 95% de confiança, tanto pelo erro puro quanto pelo SS residual, são: plastificante (L e Q) e a PML (L e Q). Já a interação PML x plastificante não é significativa pelo erro puro e nem pelo ss residual com 95% de confiança por esta razão é conveniente descartá-la.

Verificou-se, através da Figura 7 (Apêndice A), que o fator que mostrou maior efeito sobre a resposta em estudo foi plastificante (L), tendo efeito positivo sobre a resposta, ou seja, ao passar no nível -1 para o nível +1 há um aumento na porcentagem de elongação, tornando o biofilme mais elástico, entre tanto ao passar para o nível $-\alpha$ (25,86%) ou para o nível $+\alpha$ (54,14% plastificante) a resposta tem uma redução,

apresentando resultados de 103,88% e 147,3% respectivamente. Isso pode ser explicado pelo efeito antiplastificante, que segundo Galdin et al., (2000) dependendo da concentração em que os plastificante são empregados na obtenção de biofilmes, podem causar um efeito contrário do que se deseja, isto é, ao invés de aumentar a flexibilidade e hidrofiliçidade, acarreta na diminuição do alongamento.

Após a eliminação dos parâmetros com efeitos não significativos, verificou-se através da análise de variância (ANOVA) a significância da regressão e da falta de ajuste com 95% de confiança ($p \leq 0,05$), utilizando o teste F, para o planejamento estudado, conforme a Tabela 17.

Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) do modelo ajustado para alongação, referente à otimização de biofilme

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcalculado	Ftabelado ($p \leq 0,05$)	R ²
Regressão	3837,2744	4	959,3186	59,51	9,12	0,9714
Resíduo	112,8407	7	16,1201			
Falta de ajuste	97,2065	4	24,3016	4,66	9,12	
Erro puro	15,6342	3	5,2114			
Total	3950,1151	11				

SQ: soma quadrática GL: grau de liberdade MQ: média quadrática

O modelo codificado proposto para representar o comportamento da porcentagem de alongação na obtenção de biofilme é:

$$E (\%) = 133,55 - 5,46X_1 + 15,29X_1^2 + 15,47X_2 - 3,54X_2^2 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

X1: Concentração de proteína miofibrilar liofilizada (%)

X2: Concentração de plastificante Glicerol (%)

Uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F, pode não ser útil para realizar previsões por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Para uma regressão ser significativa não apenas estatisticamente, mas também ser útil para fins preditivos, o valor do teste F para a regressão deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes maior que o valor de F tabelado (BOX; WETZ, 1973). Analisando os dados da Tabela 17, verifica-se que o modelo (Equação 8), apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança. O valor da razão Fcalculado/Ftabelado da regressão é 6,52 satisfazendo o critério sugerido, por tanto, o

modelo também é útil para fins preditivos através da análise de variância (ANOVA), o valor de R^2 , para a porcentagem de alongação, estava próximo a unidade, indicando que o modelo descreveu adequadamente o comportamento do processo, explicando mais de 97% da variação dos dados experimentais.

Na Figura 8 são mostradas as superfícies de resposta e curvas de níveis gerados através do modelo proposto, considerando-se os pontos médios da proteína miofibrilar liofilizada e plastificante. Estas superfícies confirmam a análise dos efeitos realizados e permitem visualizar a variação da resposta.

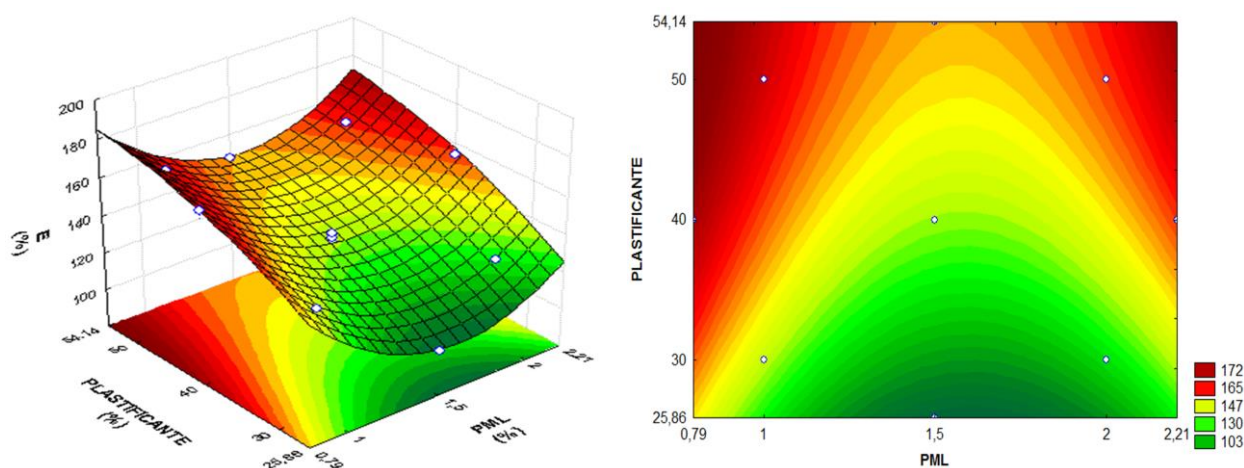


Figura 8: Superfície de resposta e curvas de nível para porcentagem de alongação, relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (%) e concentração de plastificante (%) na obtenção de biofilme.

É possível observar na Figura 8 que entre 0,8 a 1% de proteína miofibrilar liofilizada e a partir de 30% de plastificante apresenta uma região onde estão os maiores valores de alongação. Com o aumento da concentração de PML há uma diminuição na resposta em estudo.

A região que apresenta as maiores elasticidade está na faixa de 30 a 50% de plastificante com 0,8 a 1% de proteína miofibrilar liofilizada.

Dentro da faixa de trabalho escolhida, que varia 0,79% a 1 % para a concentração de proteínas miofibrilar (X1) e 30 a 50% de plastificante, optou-se por trabalhar com 0,79% de PML e 40% de plastificante por apresentar melhores comportamentos mecânico e de barreira. Confirmando com os gráficos de valores preditos e desejabilidade mostrados na Figura 9.

A Tabela 18 mostra os valores experimentais e os valores preditos pelos modelos para as respostas: permeabilidade ao vapor de água e alongação.

Tabela 18: Valores otimizados obtidos com metodologia de superfície de resposta e verificação experimental

Condições otimizadas		Valor Experimental	Valor Predito	Desvio Relativo (%)
X1	X2			
1%	40%			
PVA		6,50	6,07	6,488
E		172,12	171,67	0,264

X1: proteína miofibrilar liofilizada; X2: plastificante; PVA: ($\times 10^{-11}$ g.m. m^{-2} . s^{-1} . Pa^{-1}); E (%).

Os valores preditos pelos modelos e os valores experimentais apresentaram-se bem próximos, para cada resposta estudada, com valores de erros médios bastante reduzidos, ratificando que os modelos representaram de forma adequada as respostas estudadas no processo de obtenção de biofilme de peixe. Apesar do erro médio apresentar valor de 6,49% ainda está dentro do aceitável segundo Lomauro et al., (1985) que consideram valores com erro relativo médio abaixo de 10% indicam ajuste cabível para as práticas propostas.

4.4. DESEJABILIDADE

A estimativa das condições ótimas para a obtenção de biofilme foi realizada com base nos modelos estatísticos propostos e também com o auxílio da técnica de otimização simultânea denominada “Função Desejabilidade”.

Os perfis de desejabilidade são apresentados (Figura 9) descrevendo as condições otimizadas na obtenção do biofilme a base de proteínas miofibrilares de resíduo de dourada, dentro das faixas de valores estabelecidas nos ensaios experimentais.

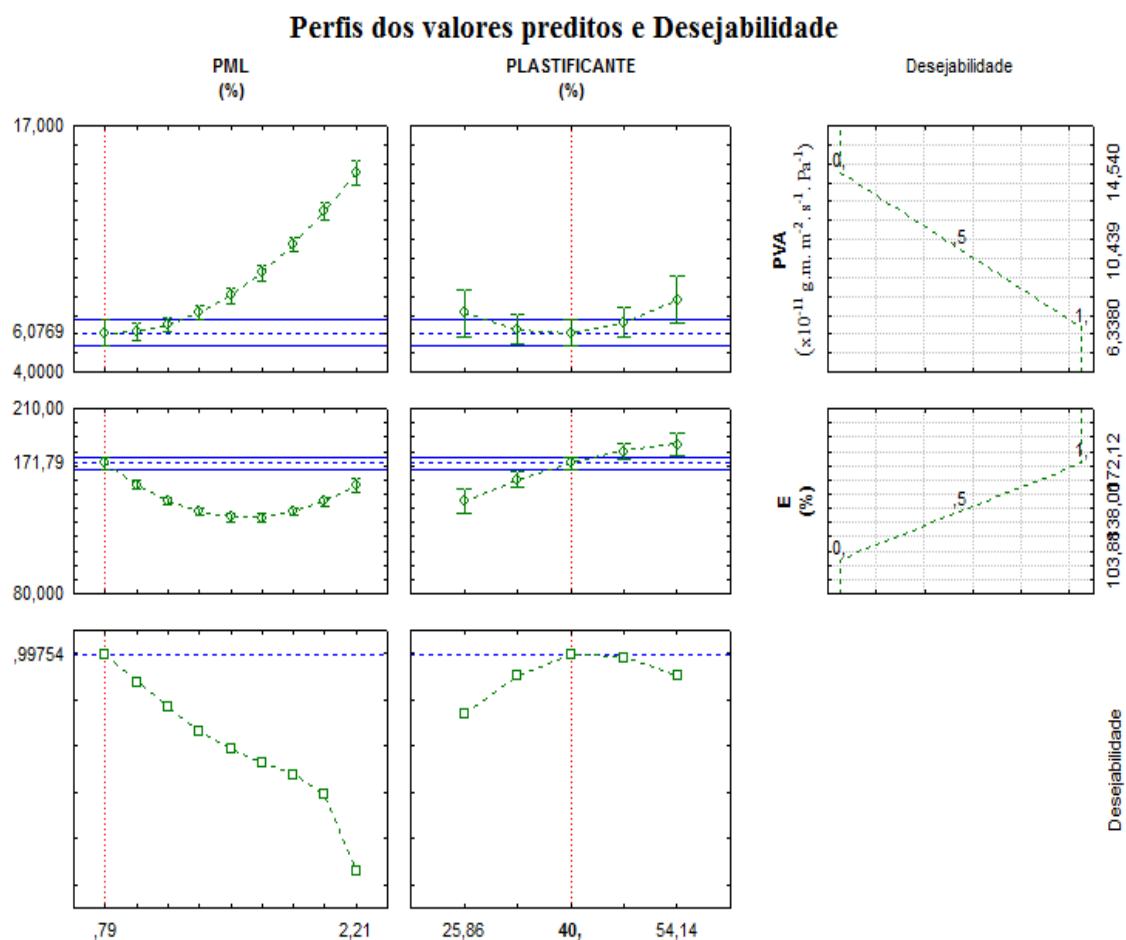


Figura 9: Perfis dos valores preditos e Desejabilidade para concentrações de PML e plastificante na obtenção de biofilme

Dois grupos de gráficos podem observados. Nos localizados acima (os quatro primeiros) apresentam-se a desejabilidade individual com os valores preditos desejáveis para as duas respostas: permeabilidade ao vapor de água (PVA) e porcentagem de alongação (E).

Apresentam-se as tendências reveladas pelas variáveis onde a linha azul tracejada representa o valor ótimo. Os gráficos correspondentes indicam que no caso da concentração de PML e concentração de plastificante, o intercepto da linha perpendicular com o máximo do gráfico demonstra claramente seus valores ótimos, a qual corresponde aos valores de $6,08 \times 10^{-11} \text{ g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ para permeabilidade ao vapor de água, próximo ao encontrado experimentalmente de $6,5 \times 10^{-11} \text{ g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$) e para a resposta porcentagem de alongação o valor ótimo mostrado pela Desejabilidade foi de 171,8%, equivalente a 172,1% encontrado experimentalmente nesse estudo.

No segundo grupo, mostram os perfis das desejabilidade das duas respostas, definidas de acordo com os valores escolhidos para os limites e níveis de acordo com a Tabela 3. As linhas tracejadas verticais (em vermelho) sinalizam as condições de máxima desejabilidade global, por tanto, o ponto ótimo encontrado pela avaliação dos resultados foi de 0,997 o que corresponde a mais 99% de confiança, mostrando que as concentrações ótimas dos dois fatores em estudo são as seguintes: 0,79% de proteína miofibrilar liofilizada (nível – 1,41) e 40% de plastificante (nível 0), tendo em vista, o ensaio 7 como o melhor biofilme formado.

De acordo com esta discussão é possível afirmar, que os resultados obtidos com a função “Desejabilidade” foram compatíveis com os experimentais analisados através da superfície de resposta.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME OTIMIZADO

Os resultados da caracterização mecânica, física, química e de barreira do biofilme final estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19: Caracterização mecânica, física, química e barreira do biofilme otimizado

Determinações	Resultados
Elongação (%)	178,08 ± 1,484
Resistência a Tração (MPa)	4,915 ± 1,010
Espessura (mm)	0,033 ± 0,516
PVA ($\times 10^{-11}$ g.m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹)	6,42 ± 0,041
Solubilidade (%)	19,46 ± 0,028
Parâmetros de cor	
L*	92,31 ± 0,291
a*	-5,81 ± 0,008
b*	9,87 ± 0,009
h*	120,36 ± 0,042
C*	11,44 ± 0,014
ΔE^*	3,71 ± 0,029

4.5.1. Elongação

O alongamento é uma medida de flexibilidade do biofilme e pode ser considerada como uma característica que define a capacidade do mesmo para se deformar até a ruptura. De acordo com a Tabela 19 o biofilme apresentou elongação de 178,08% e esta deformação foi superior aos resultados encontrado por Tongnuanchan; Benjakul; Prodpran (2011) de 50,38% a 63,02% trabalhando com

biofilme de proteínas de peixe. Segundo Zavareze et al., (2014) o aumento da porcentagem de elongação está diretamente ligada a concentração de plastificante adicionada na solução filmogênica. Este comportamento é devido à capacidade do glicerol em reduzir as interações entre as cadeias dos polímeros, diminuindo assim a resistência do biofilme e aumentando a sua flexibilidade (Sothornvit; Krochta, 2000).

É possível fazer uma relação do alongamento na ruptura com pH da solução, neste trabalho o pH foi ajustado para 11 e pH alcalino favorece a solubilização das moléculas de proteínas, o que resultou em maior extensão ou alongamento do biofilme tornando os mais flexíveis.

4.5.2. Resistência a tração

A resistência a tração encontrada neste trabalho foi de 4,91 MPa semelhante aos resultados encontrados por Zavareze et al. (2012) de 4,09 a 5,76 MPa. Os biofilmes devem ter uma resistência mecânica suficiente para garantir a integridade dos mesmos quando utilizados como embalagem. De acordo com Perez-Gago e Krochta (2001), as proteínas miofibrilares fornece maior quantidade de grupos sulfidrílicos na superfície da proteína, promovendo maior número de pontes covalentes S-S na matriz do filme, formando, assim, filmes mais resistentes.

4.5.3. Espessura

Ainda na Tabela 19 é apresentado o valor da espessura do biofilme otimizado de 0,033 mm. Uma ampla faixa de valores de espessura para filmes biodegradáveis tem sido reportada na literatura e, de acordo com García e Sobral (2009), a espessura do filme é dependente da sua composição e dos parâmetros de processamento do biofilme. A maior concentração de proteínas utilizada na formulação dos biofilmes induz ao aumento de sólidos na matriz polimérica formada após a secagem da solução formadora, aumentando a espessura dos biofilmes. A espessura encontrada nesse trabalho é considerada baixa e está relacionada com a concentração de PML, haja a vista que, o melhor ensaio corresponde a menor concentração de proteínas (0,78%).

Segundo Sobral (2000), nem sempre o efeito de possíveis variações das propriedades dos filmes é consequência da variação da espessura, porém é fundamental considerá-la. O mesmo autor afirma que o controle da espessura dos biofilmes é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting*.

4.5.4. Permeabilidade ao vapor de água

A Tabela 19 mostra o resultado de permeabilidade ao vapor de água encontrada no biofilme final de $6,42 \times 10^{-11} \text{ g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ próximo aos encontrados por Arfat et al. (2014). Normalmente, a proteína de músculo de peixe é hidrofílica, devido aos seus aminoácidos polares e grande número de grupos hidroxilo (OH), como consequência, o biofilme de proteína muscular tem baixa propriedade de barreira a umidade (PASCHOALICK et al., 2003).

A PVA está relacionada com a incorporação de plastificante devido a abertura da cadeia de proteína, cuja estrutura e organização molecular modifica, com conseqüente aumento do volume livre que diminui a densidade de interações. Adicionalmente, diminui-se a densidade de interações tornando a rede mais frouxa, e, portanto, mais solúvel devido o aumento de grupos hidrofílicos expostos, que irão interagir com a molécula de glicerol, intensificando a afinidade pela água, e aumentando a permeabilidade ao vapor de água (McHUGH; KROCHTA, 1994; CHERIAN et al., 1995; CUQ et al., 1997; OCUNO; SOBRAL, 1998).

Segundo Zavareze et al. (2012), os biofilmes elaborados com maior concentração de proteínas apresentaram maior permeabilidade ao vapor de água, este aumento está diretamente relacionada com o número de grupos polares (grupos laterais dos aminoácidos polares) disponíveis nas cadeias proteicas, desta forma é possível afirmar que o biofilme otimizado apresentou baixa permeabilidade devido a adição de menor concentração de proteína miofibrilar liofilizada (0,79%).

4.5.5. Solubilidade

A solubilidade do biofilme é consequência da perda da integridade estrutural dos mesmos, bem como da hidroflicidade do plastificante, e do grau de desnaturação da proteína. A solubilidade dos filmes produzidos neste trabalho, de modo geral, apresentou valor baixo de 19,46% (Tabela 19) para o biofilme otimizado, comparados a outros filmes. Cuq *et al.* (1995) e Monterrey- Quintero; Sobral (1999) observaram, em filmes a base de proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico e tilápia- do-Nilo, valores entre 33-47% e 12,3-19,5%, respectivamente. O biofilme apresentou-se inteiro e intacto quanto à forma, bem flexível e dobrável ao manuseio, após permanecerem imersos em água por 24 horas sob agitação.

Segundo Moraes *et al.* (2011) do ponto de vista prático, a baixa solubilidade dos biofilmes, a base de proteínas miofibrilares, permiti visualizar um grande potencial de aplicação em alimentos com alto teor de umidade.

4.5.6. Cor instrumental

Na Tabela 19 são apresentados os parâmetros de cor para o biofilme final, mostrando alto valor de luminosidade (92,31), superior aos encontrados por Limpan *et al.* (2010) numa faixa que variou de 89,89 a 90,61.

O valor de $-a^*$ (intensidade de verde) encontrado neste trabalho foi maior que os encontrados por Arfat *et al.* (2014) e mostrando também que o biofilme tem uma tendência a coloração amarela ($+b$: 9,87).

O maior valor de croma representa a mais pura e intensa cor e segundo Ferreira (1991) croma é a “força da cor”, que pode ser utilizada na distinção de uma cor fraca e uma cor forte, ou seja, a intensidade de um tom distinto ou a intensidade da cor. Foi observado que o valor de C^* foi de 11,44 como o croma é dependente de a^* e b^* na mesma intensidade, verificou-se que esta combinação apresenta uma tendência a coloração clara, o que já era esperado, visto que, o resíduo da dourada utilizado como matéria-prima na obtenção do biofilme em estudo exibiu coloração também clara.

Este resultado também está relacionado com o pH (11) ajustado na solução formadora do biofilme, pois segundo Tongnuanchan; Benjakul; Prodpran (2011) sugerem que uma condição alcalina podem induzir a formação de pigmento amarelado, especialmente através da reação de Maillard, tendo em vista, que pH alcalino favorece a formação de reductona sobre a produção de furfural a partir dos produtos de Amadori, levando ao desenvolvimento da cor em biofilmes.

Em relação a diferença total de cor (ΔE), pode se afirmar que o biofilme otimizado apresentou um resultado satisfatório de 3,71 em comparação ao encontrado por Arfat *et al.* (2014) com valor de 7,67.

4.5.7. Transmissão de luz e transparência

Os resultados das análises transmissão de luz e transparência no biofilme otimizado são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Transmissão de luz e transparência do biofilme otimizado

<i>Transmissão de luz (%)</i>								<i>Valor de Transparência</i>
200*	280	350	400	500	600	700	800	
53,56	0,5	78,73	80,3	86,7	86,10	98,06	87,97	1,97 ± 0,007

*Valores em negrito representam comprimento de onda (nm)

A Tabela 20 apresenta a transmissão de luz em diferentes comprimentos de onda (200-800 nm) e transparência a (T600 /mm), onde foi possível observar a transmissão de luz foi mais baixa nos comprimentos de onda na faixa do visível de 200 a 280 nm e nos comprimentos superiores a estes a propriedade de barreira a luz tornou-se reduzida na faixa do UV. Este mesmo comportamento foi apresentado no trabalho de Arfat et al., (2014).

O biofilme apresentou transparência de 1,79 próximo ao encontrado por Shiku; Hamaguchi; Tanaka (2003), os quais compararam a transparência dos biofilmes de proteínas miofibrilares de peixe com filmes sintéticos. O resultado encontrado neste trabalho ficou próximo ao filme de polipropileno e poliéster (1,67 e 1,51) respectivamente, e bem abaixo do valor encontrado para biofilme de peixe em pH 11 (8,34). Quanto menor o valor maior é a transparência, por tanto, estes resultados sugerem que o biofilme de proteínas miofibrilares de dourada é transparente e claro o suficiente para visualizar o produto através da embalagem. Esta afirmação pode ser confirmada através da Figura 10.



Figura 10: Biofilme obtido com proteínas miofibrilares de dourada com 0,79% de PML e 40% de plastificante.

Fonte: Autora, 2015

4.5.8. Morfologia da superfície e secção transversal do biofilme otimizado

Os resultados da microscopia eletrônica dos biofilmes contendo 0,79% de proteína miofibrilar liofilizada e 40% de glicerol (biofilme otimizado) da superfície e do corte transversal estão apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

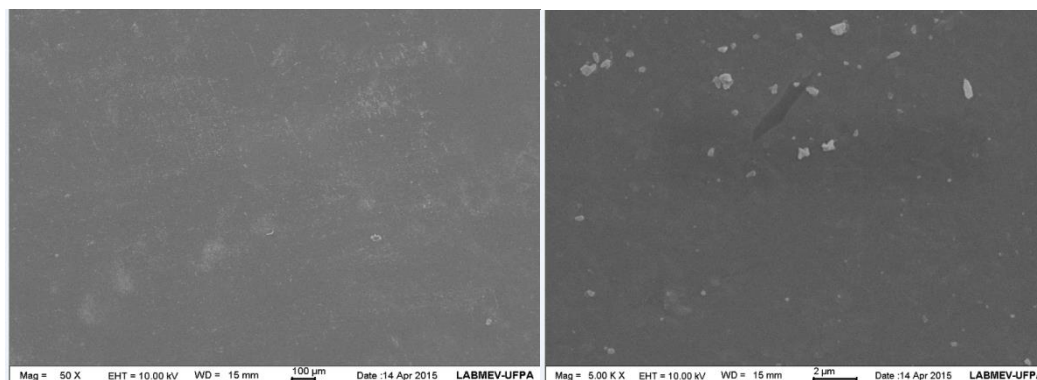


Figura 11: Microfotografias da superfície do biofilme (0,79% PML e 40% Plastificante); 50X e 5000X respectivamente

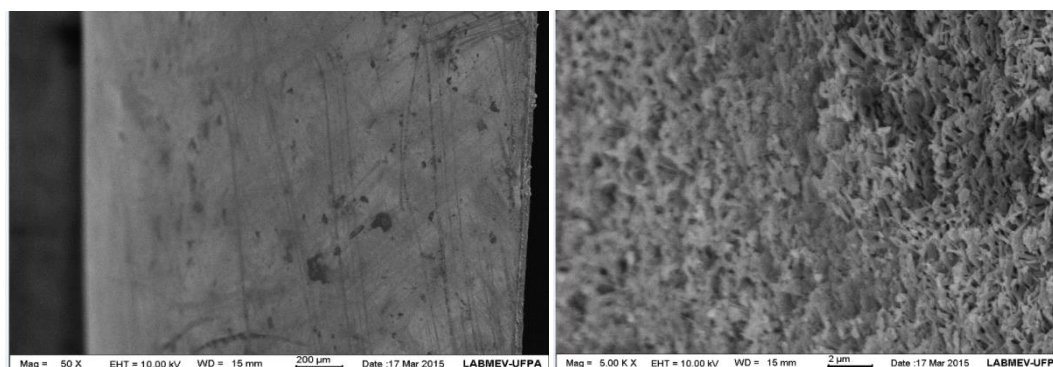


Figura 12: Microfotografias do corte transversal do biofilme (0,79% PML e 40% Plastificante); 50X e 5000X respectivamente

As imagens da superfície do biofilme revelaram uma estrutura relativamente homogênea, onde as proteínas miofibrilares agregaram-se para formar a rede densa e contínua. Esta rede pode associada com a baixa solubilidade (19,46%) e a permeabilidade ao vapor de água ($6,46 \times 10^{-11} \text{ g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$).

A matriz de proteína mostrou alguns pontos brancos, que podem ser algum tipo de materiais insolúveis em solução salina de baixa concentração (0,05M). Observou-se também, embora em pequeno número, descontinuidade na rede protéica, identificada como fenda, visível no detalhe da imagem com resolução de 5000X. Essa fenda deve ter sido ocasionada pelo tratamento de vácuo aplicado à amostra, no preparo para microscopia, que pode ter eliminado a glicerina livre, isto é, não

totalmente miscível com as proteínas miofibrilares. Essa mesma observação foi realizada com biofilmes de proteínas miofibrilares de Tilápia do Nilo, por MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, (2000).

De acordo com Souza; Sobral; Menegalli, (2004), a presença de fendas e irregularidades nas estruturas dos biofilmes podem comprometer a integridade estrutural do biofilme e, conseqüentemente provocar modificações nas suas propriedades funcionais. Contudo, apesar das de algumas falhas encontradas no biofilme em estudo, o mesmo apresentou excelentes características físicas e mecânicas.

Na Figura 12 é apresentada as imagens do corte transversal do biofilme otimizado, onde é possível observar desuniformidades ao longo da seção do biofilme. Essa heterogeneidade se deve provavelmente, aos canais formados no interior da estrutura do biofilme, quando há saída da água durante a secagem, com conseqüente formação de poros. Na imagem de 5000X aparece um grande número de cavidades que podem ser espaços vazios ocupados por frações de glicerol retiradas da matriz do biofilme durante a aplicação do vácuo.

A microestrutura dos biofilmes de proteínas miofibrilares de dourada, observada tanto na superfície quanto na seção transversal, foi típica de uma rede de proteína não homogênea, com raras falhas, porém densa e coesa.

5. CONCLUSÃO

As proteínas miofibrilares extraídas e liofilizadas das aparas da dourada mostraram-se excelentes matérias-primas para a elaboração de biofilmes com teor proteico de 96,58%.

O biofilme elaborado exibiu características promissoras, pois foi capaz de apresentar-se com aspectos homogêneos, transparentes, resistentes e flexíveis, além de baixa solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, os quais podem ser utilizados para fins específicos de embalagem de alimentos.

Dentre as variáveis independentes estudadas, a concentração de proteína foi a que exerceu maior efeito significativo sobre as propriedades mecânicas, física e de barreira dos biofilmes obtidos a partir de resíduo de peixe.

O biofilme otimizado exibiu melhores resultados nas concentrações de 0,79% de proteínas miofibrilares liofilizadas e 40% de plastificante.

Conclui-se que é viável elaborar filmes biodegradáveis (biofilme) utilizando-se proteínas miofibrilares de dourada, pela técnica *casting*, podendo ser um meio para promover o uso de resíduos em grande parte descartados pela indústria processadora de pescado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, B.; CHIPMAN, H. VIJAYAN, K. Some risks in the construction and analysis of supersaturated designs. **Technometrics**. v. 41, p. 135-141, 1999.

AGUIAR, G. P. S.; GOULART, G. A. S. Utilização de material residual da indústria de pescado para obtenção de óleo e farinha. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 7, p. 55-60, 2013.

ALONSO, J.C. **Padrão espaço temporal da estrutura populacional e estado atual da exploração pesqueira da dourada *Brachyplatystoma flavicans*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae), no sistema Estuário-Amazonas-Solimões**. Tese (Dourorado em Biologia de água doce e pesca interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas (INPA/UFAM), 2002.

ÁLVAREZ-PARRILLA, E.; LLUCH, A. P. M. A. Preparación y caracterización química y microestructural de surimi de merluza (*Merluccius merluccius*) y de jurel (*Trachurus trachurus*). **Food Science and Technology Internacional**. v. 3, p. 49-60, 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **D882-91: Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Philadelphia (Annual Book of ASTM Standards), 1996.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. **E96-95: Designation Standard Method for Water Vapor Transmission of Materials**. Philadelphia (Annual Book of ASTM Standards), 1995.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) **Official methods of Analysis**. 16° ed, 3rd rev, 1997.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/pesca>> Acesso em Mar. 2015a.

BRASIL, Secretaria Estadual de Pesca e Aquicultura (SEPAq). Pará, 2013. Disponível em: <<http://www.sepaq.pa.gov.br/?q=node/659>>. Acesso em Mar. 2015b.

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; OSAKO, K. Development and characterisation of blend films on fish protein isolate and fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 58-67, ISSN 0268-005X, 2014.

ARRIETA, M.P.; LOPEZ, J.; HERNADEZ, A.; RAYÓN, E. Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. **European Polymer Journal**. v. 50, p. 255-270, ISSN 0014-3057, 2014.

ARTHAM, A.; BENJAKUL, S. THUMMANOON, P.; TANAKA, M. Properties of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) as affected by muscle types and washing. **Food Chemistry**. v. 103, p. 867-874, 2007.

BADOLATO, E.S.G; AUED-PIMENTEL, S.; TAVARES, M.; MORAIS, C. Sardinhas em óleo comestível. parte II. Estudo da interação entre os ácidos graxos do peixe e do óleo de cobertura. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p.21-26, 1994.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 3ª ed. Campinas: UNICAMP, 2001.

BARTHEM, R.B.; GOULDING, M. An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries. **Botanical Garden Press**. p. 241, 2007.

BATISTA, J. S. **Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microsatélites: subsídios para conservação e manejo**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, BTRN/INPA/UA, Manaus, Amazonas, 2010.

BERTRAM, H.C.; KRISTENSEN, M.; ANDERSEN, H.J. Functionalily of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment- a low-field NMR study. **Meat Science**. v. 68, p. 249-256, 2004.

BORGHESI, R. **Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduos do beneficiamento da Tilapia do Nilo (*Oreochomis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado

em Ciências) Escola Superior da Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2004.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments – An introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley Series in Probability and Mathematic Statistics, 1978.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: Design, innovation and discovery**. 2 ed. New York: John Wiley; Sons, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. **Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura**. Brasília, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001: **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos**. Brasília, 2001.

BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2012**. MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura: Brasília. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2014>> Acessado em 23 Jan. de 2014.

CARVALHO, R. F.; SILVA, M. D. P.; DELÍCIO, H. C.; ASSIS, J. M. F. Análise morfológica da musculatura miotomal de *Brycon cephalus*. **Brazilian Journal of Morphological Science** v. 17, p.181-181, 2000.

CHEOW, C. S. et al. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). **Food Chemistry**, v. 101, p. 386–391, 2007.

CHINABAHARK, K.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of pH properpies of protein-based film from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi. **Bio-resource Technology**. v. 98, p. 221-225, 2007.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 409p. 1994.

CORTEZ-VEGA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A. PRENTICE, C. Nanocomposite biofilms obtained from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and Monmorillonite: Evaluation of the physical, mechanical and barrier properties. **Journal of Food Technology**. v. 16, p. 90-98, 2013.

CUQ, B. Formation and Properties of Fish Myofibrillar Protein Films and Coating. Em **Protein-Based Film and Coating** (editado por Gennadios, A.). p. 213- 224. New York: ed. CRC Press. 2002.

CUQ, B. **Mise en Forme et Caractérisation de Biomatériaux à Base de Protéines Myofibrillaires. Montpellier.** Tese (Doutorado em Biochimie et technologies Alimentaires), Université Montpellier, p. 213, 1996.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Food Science**, v. 60, p. 1369-1374, 1995.

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

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

DEJAEGUER, B.; DURAND, A.; HEYDEN, Y. V. Identification of significant effects from na experimental screening design in the absence of effect sparsity. **Journal of Chromatography B**. v. 877, p. 2252-2261, 2009.

DENAVI, G.; TAPIA-BLACIDO, D.R.; ANON, M.C.; SOBRAL, P.J.A., MAURI, A.N.; Menegalli, F.C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Food Engineering**. v. 90, p. 341-349, 2009.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINIELLO, L.; DAMAIO, A. E.; MASI, P.; PORTA, R. Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the

Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 3, p. 744-749, 2006.

DRAPER, N. R.; LIN, D. Small response-surface designs. **Technometrics**. v. 32, p. 87– 194, 1990.

EYMARD, S.; CARCOUET, E.; ROCHET, M. J.; DUMAY, J.; CHOPIN, C.; GENOT, C. Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 85, p. 1750-1756, 2005.

FALCH, E.; RUSTAD, T.; AURSAND, M. Products from gadiform species as raw material for production of marine lipids as ingredients in food or feed. **Process Biochem**, n. 41, p.666–674, 2006.

FAMÁ, L.; ROJASB, A.M.; GOYANESA, S.; GERSCHENSONB, L. Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. **LWT- Food Science and Technology**. v. 38, p. 631-639, 2005.

FAUSTMAN, C.; SUN, Q.; MANCINI, R.; SUMAN, S. P. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. **Meat Science**. v. 86, p. 86-94, 2010.

FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.; SANTOS, GM. Peixes comerciais do médio Amazonas - Região de Santarém, PA. Brasília: **Imprensa Oficial**. p. 211 , 1998.

FICHTATI, J.; VOORT, F. R.; KHURY, A. I. Multiresponse optimization of acid casein production. **Journal of Food Process Engineering**. V.12, p.247–258, 1990.

FLOROS, J.; CHINNAN, M. Seven factor response surface optimization of a double-stage lye (NaOH) peeling process of pimiento peppers. **Journal of Food Science**. v. 53, p. 631– 638, 1988.

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 protein of two varieties of Tilapia. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 289-296, 2005.

GARRIDO, T.; ETXABIDE, A.; LACETA, I.; CABEZUDO, S.; CABA, K.; GUERRERO, P. Valorization of soya by-products for sustainable packaging. **Journal of Cleaner Production**. v. 64, p. 228-233, ISSN 0959-6526, 2014.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T.H.; WELLER, C.L.; KROCHTA, J.M. Edible Coatings and Films Based on Protein. Em **Edible Coating and Films to Improve Food Quality**. (editado por Krochta, J.M.; Baldin, E.A. e Nisperos-Carriedo, M.). p. 210-278, 1994.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: ed. Atheneu, 2011.

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

GONTARD, N.; GUILBERT, S. e CUQ, J.L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Food Science**. v. 58, p. 206-211, 1996.

GUILBERT, S.; BIQUET, B. **Películas y envolturas comestibles. Embalaje de los alimentos de gran consumo**. Zaragoza: ed. Acribia , cap. 22. p. 331-371, 1995.

GUILBERT, S.; GONTARD, N. Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics. **Innovations in Food Packaging**. p. 263-276. 2005.

GUILBERT, S.; GONTARD, N. GORRIS, G. M. Prolongation of the self-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie**. v. 29, p. 10-17, 1996.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L.G.M. Prologation of the shelf-live of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 29, p. 10-17, 1996.

HAMAGUCHI, P. Y.; YIN, W.W.; TANAKA, M. Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of blue marlin (*Makaira mazara*). **Food Chemistry**. v. 100, p. 914-920, ISSN 0308-8146, 2007.

HASTINGS, R.J.; RODGER, G.W.; PARK, R.; MATTHEWS, Q.D.; ANDERSON, E.M. Differential scanning calorimetry of fish muscle: the effect of processing and species variation. **Journal of Food Science**. v. 50, p.503-510, 1985.

HOQUE, M.S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Properties of film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin and mungbean protein isolate. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 49, p. 663-673, 2011.

HUNTERLAB INC. **Measuring Color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L*a*b***. p. 1–4, 2012.

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.

JANJARASSKUL, T.; KROCHTA, J.M. Edible packaging materials. **Annual Review of Food Science and Technology**. v. p. 415–448, 2010.

JIPA, J. M.; STROESCU, M.; GUZUN, A. S.; DOBRE, T.; JINGA, S.; ZAHARESCU, T. Effect of gamma irradiation on biopolymer composite films of poly (vinyl alcohol) and bacterial cellulose. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**. p. 82-87, ISSN 0168-583X, 2012.

KESTER, J.J. e FENNEMA, O.R. Edible film and coatings: A review. **Food Technology**. v. 40, p. 47-59, 1986.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**. p. 61- 73, 1997.

KROCHTA, J.M. Protein as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities. **FL: CRC Press**. p. 1–41, 2002.

KUBITZA, F. **Aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescados. Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 16, p. 23-29, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LIM, L.T.; MINE, Y.; TUNG, M.A. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, p. 4022-4029, 1998.

LIMPAN, N.; PRODPRAN, T.; BEMJAKUL, 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. 20, p. 223-236, ISSN 0268-005X, 2012.

LIMPAN, N.; PRODPRAN, T.; BEMJAKUL, S.; PRASARPRAN, S. Properties of biodegradable blend films on fish protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**. v. 100, p.85-92, ISSN 0260-8774, 2010.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro, 2001.

LUNDBERG, J.; LITTMANN, M.W. Family Pimelodidae: Long-Whiskered catfishes. Em **Check list of the freshwater fishes of south and central America** (editado por Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris, C.J), Porto Alegre-RS. p. 432-446. 2003.

MACEDO-VIEGAS, E. M.; SOUZA, M. L. R.; ZUANON, J. A. S.; FARIA, R. H. S. Rendimento e composição centesimal de filés in natura e pré-cozidos em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Wallbaum). **Acta Scientiarum**. v.24, p.1191-1195, 2002.

MADRID, A.; VICENTE, J. M.; MADRID, R. **El pescado y sus productos derivados**. 2ª Ed. Madrid, p. 411, 1999.

MARQUIÉ, C. e GUILBERT, S. Formation and Properties of Cotton Seed Protein Films and Coating. Em **Protein-Base Films and Coating**. (editado por Gennadios, A.), p. 143-149. New York: ed. CRC Press, 2002.

MATTA, J. M. D.; SARMENTO, S. B. S.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ZOCCHI, S. S. Propriedades de Barreira e Solubilidade de Filmes de Amido de Ervilha Associado com Goma Xantana e Glicerol. **Polímeros**. v. 21, p. 67-72, INSS 0104-1428, 2011.

MCCORMICK, R.T. Structure and Properties of Tissues. **Muscle Food**. p. 25-62, 1994.

MCHUGH, T. H. e KROCHTA, J. M. Milk protein based edible film and coating. **Food Technology**. v. 48, p. 97-103, 1994.

MESQUITA, M.S.C. **Elaboração de produtos da pasta da pescada do Piauí, *Plagioscion squamosissimus* Hechel (1840), como alternativa para uma fonte alimentar nutritiva**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

MINOZZO, M. G. “**Patê de pescado: alternativa para incremento da produção nas indústrias pesqueiras**”. Tese (Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

MONTERREY-QUINTERO, E. S. **Caracterização físico-química de proteínas miofibrilantes e elaboração de biofilme**. Dissertação: (Mestrado em Zootecnia/Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 1998.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e Caracterização de Proteínas Miofibrilares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, p. 179-190, 2000.

MORAES, J. O. **Propriedades de filmes de amido incorporados de nanoargilas e fibras de celulose**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico (CTC). Florianópolis, 2009.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. São Paulo: Artliber, 2009.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymer**, v. 72, p. 82-87, 2008.

MYERS, R. H. **Response surface methodology**. Boston: Allyn and Bacon. 1971.

NUTHONG P.; BENJAKUL S.; PRODPRAN, T. Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 44, p.143-148, 2009.

OETTERER, M. **Agroindústrias beneficiadoras de pescado: unidades modulares e polivalentes para implantação com enfoque nos pontos críticos, higiênicos e nutricionais**. Piracicaba. Tese – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, 1999.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca**. São Paulo: Ed. Varela, 1999.

PARK, J.W.; LANIER, T.C. Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and actin due to processing of muscle and protein purification. **Journal of Food Scienc**. v.54, p.49-51, 1989.

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**. v. 17, p. 419-427, 2003.

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Food Science**. v. 66, p. 705-710, 2001.

PIRES, C.; RAMOS, C.; TEIXEIRA, G.; BATISTA, L.; MENDES, R.; LUNES, I.; MARQUES, A. Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. **Journal of Food Engeneering**, v. 105, p.422-428, ISSN 0260-8774, 2011.

PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; PHATCHARAT, S. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 51, p. 774-782, 2012.

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

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

RHIM, J.W.; PARK, H. M.; HÁ, CHANG, C.S. Bio-nanocomposites for packaging applications. **Progress in Polymer Science**. v. 38, ISSN 0079-6700, 2013.

ROY, S.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; TESTIN, R.F. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. **Journal Industrial Crops and Products**. v.11. p. 43-50, 2000.

SANTOS, G. M.; SANTOS, A. C. M. **Sustentabilidade da pesca na Amazônia**. Acta Amazônica, 19 (54): p. 165-182. 2005.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; **Embalagens Plásticas Flexíveis: principais polímeros e avaliação das propriedades**. Campinas. CETEA/ITAL. 2002.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J.M.J. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. **Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 700-703, 2000.

SHELLHAMMER, T.H.; KROCHTA, J.M. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. **Food Science**. v. 62, p. 390-394, 1997.

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**. v. 86, p. 493-499, 2004.

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

SIKORSKI, Z.E., KOLAKOWSKA, A.; PAN, B.S. 1990. The Nutritive Composition of the Major Groups of Marine Food Organism. **Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation**. p. 29-54, 1990.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SOBRAL, P. J. do A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A. de; SOUZA, S. M. A. de; QUINTERO, E. S. M. Elaboração de filmes de proteínas para uso como impermeabilizante ou embalagem flexível. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL: TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PROTEÍNAS. **Campinas: ITAL**, p. 95-104, 1997.

SORBAL, P.J.A., SANTOS, J.S.D.; GARCIA, F.T. Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. **Journal of Food Engineering**. v. 70, p. 93-100, 2005.

SOUZA, S.M.A.; SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C. Physical properties of edible films based on bovine myofibril proteins. **Seminário: Ciências Agrárias**. v.33, p. 283-296, 2012.

STATSOFT. **Statistica for Windows**, versão 7.0. (Software estatístico), 2004.

STUCHELL, Y.M.; KROCHTA, J.M. Edible coatings on frozen king salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. **Food Science**. v. 60, p. 28-31, 1995.

SUZUKI, T. **Tecnologia de las proteínas de pescado y krill**. Zaragoza: Acribia, p. 230, 1987.

TANAKA, M.; IWATA, K.; SANGUANDEEKUL, R.; HANDA, A.; ISHIZAKI, S. Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. **Fish Science**. v. 67, p. 346-351, 2001.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Food Science and Technology**. v. 14, p. 71-78, 2003.

WENDLANDT, W.W. Thermal Analysis. New York: John Wiley; Sons. **Chemical analysis**. p. 1, v. 19, 3.ed. 1986.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of automatic chemistry**, v. 8, p. 170–7, 1986.

XIONG, Y. L.; BREKKE, C. J. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during storage. **J. Food Science**. V. 54, p. 1141 – 1146, 1989.

XIONG, Y. Structure-Function Relationships of Muscle Protein. **Food Proteins and Their Applications**. p. 341-392, 1997.

ZAVAREZE , E. R., HALAL , S. L. M.; SILVA, R. M.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ , C. Mechanical, barrier and morphological properties of biodegradable films based on muscle and waste proteins from the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*). **Journal of Food Processing and Preservation**. ISSN 1745-4549, 2013.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S.L.M.; TELLES, A. C.; HERNANDES, P. Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Brazilian Journal of Food Technology**. p. 53-57, 2012.

APÊNDICE A

Tabela 12: Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e grau de significância estatística, para cada fator de PVA, referente à otimização do processo

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	T(3)	Significância estatística (p)
<i>Efeitos principais</i>		Para PVA		
PML (L)	5,953745	0,119603	49,77921	0,000018
PML (Q)	2,240338	0,134079	16,70908	0,000467
PLASTIFICANTE (L)	-0,202500	0,119603	-1,69310	0,189012
PLASTIFICANTE (Q)	1,391336	0,134079	10,37699	0,001910
Interação dos fatores	-0,487500	0,168892	-2,88645	0,063195

(L): linear (Q): quadrático

Tabela 13: Efeito estimado, SS residual, coeficiente t e grau de significância estatística, para cada fator de PVA, referente à otimização do processo

Fatores	Efeito estimado	SS Residual	T(4)	Significância estatística (p)
<i>Efeitos principais</i>		Para PVA		
PML (L)	5,953745	0,241534	24,64977	0,000000
PML (Q)	2,240338	0,270767	8,27404	0,000169
PLASTIFICANTE (L)	-0,202500	0,241534	-0,83839	0,433933
PLASTIFICANTE (Q)	1,391336	0,270767	5,13850	0,002139
Interação dos fatores	-0,487500	0,341072	-1,42932	0,202846

(L): linear (Q): quadrático

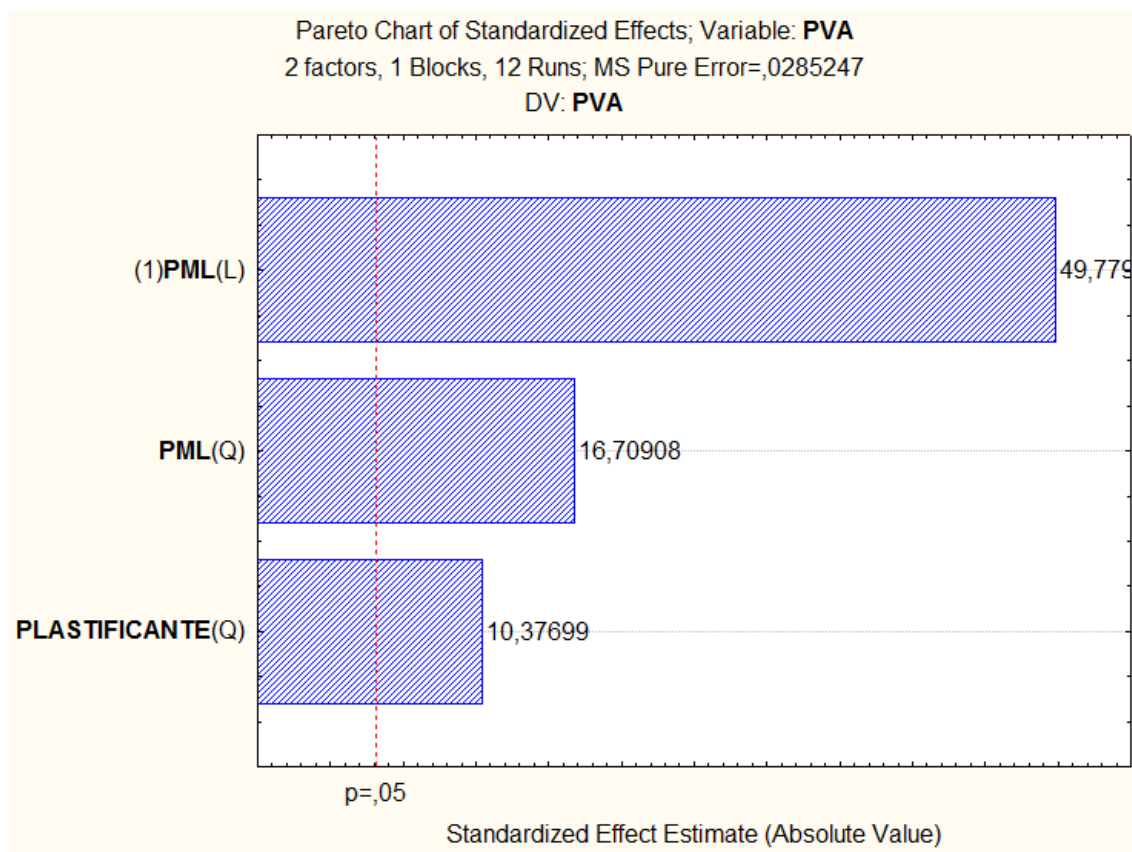


Figura 6: Gráfico de Pareto dos efeitos significativos para o parâmetro PVA na obtenção de biofilme

Tabela 15: Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e grau de significância estatística, para cada fator de alongação, referente à otimização do processo

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	T(4)	Significância estatística (p)
<i>Efeitos principais</i>		Para % ELONGAÇÃO		
PML (L)	-10,9314	1,616624	-6,7619	0,006608
PML (Q)	30,5946	1,812290	16,8817	0,000453
PLASTIFICANTE (L)	30,9469	1,616624	19,1429	0,000311
PLASTIFICANTE (Q)	-7,0720	1,812290	-3,9023	0,029876
Interação dos fatores	1,7050	2,282849	0,7469	0,509346

(L): linear (Q): quadrático

Tabela 16: Efeito estimado, SS residual, coeficiente t e grau de significância estatística, para cada fator de alongamento, referente à otimização do processo

Fatores	Efeito estimado	SS Residual	T(5)	Significância estatística (p)
<i>Efeitos principais</i>		Para ELONGAÇÃO		
PML (L)	-10,9314	1,616624	-6,7619	0,006608
PML (Q)	30,5946	1,812290	16,8817	0,000453
PLASTIFICANTE (L)	30,9469	1,616624	19,1429	0,000311
PLASTIFICANTE (Q)	-7,0720	1,812290	-3,9023	0,029876
Interação dos fatores	1,7050	2,282849	0,7469	0,509346

(L): linear (Q): quadrático

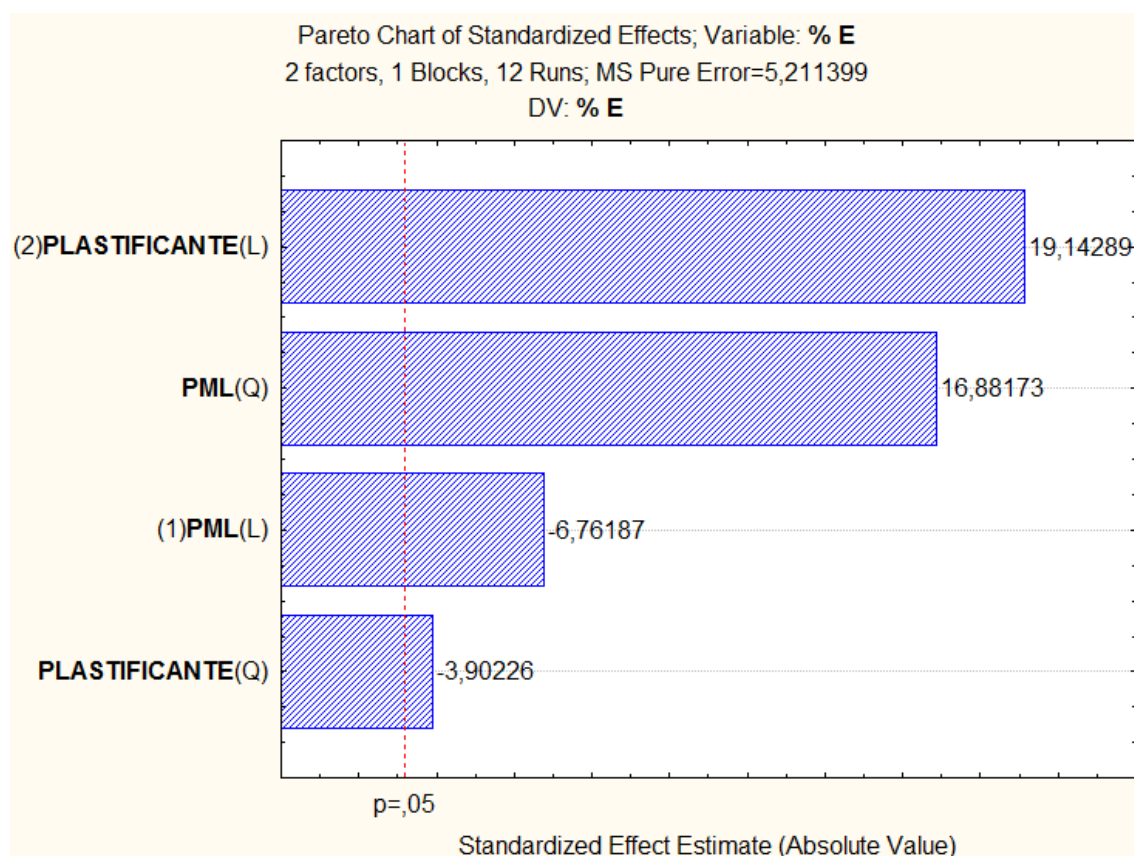


Figura 7: Gráfico de Pareto dos efeitos significativos para o parâmetro Alongamento na obtenção de biofilme