



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

GLAUCE VASCONCELOS DA SILVA PEREIRA

**Otimização do processo de obtenção de filmes biodegradáveis
com proteínas miofibrilares a partir de subprodutos de pescada
amarela (*Cynoscion acoupa*)**

BELÉM - PA

2015

GLAUCE VASCONCELOS DA SILVA PEREIRA

Otimização do processo de obtenção de filmes biodegradáveis com proteínas miofibrilares a partir de subprodutos de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

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

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

Co-orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Suezilde da Conceição Amaral Ribeiro

BELÉM – PA

2015

GLAUCE VASCONCELOS DA SILVA PEREIRA

Otimização do processo de obtenção de filmes biodegradáveis com proteínas miofibrilares a partir de subprodutos de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*)

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

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

Co-orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Suezilde da Conceição Amaral Ribeiro

Data de Avaliação: ____/____/____

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^{fa}. Dr^a. Lucia de Fátima Henriques Lourenço
(FEA/ITEC/UFPA – Orientadora)

Prof^{fa}. Dr^a. Suezilde da Conceição Amaral Ribeiro
(PPGCA/CCNT/UEPA – Co-orientadora)

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

Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

RESUMO

Os problemas ambientais causados pelo descarte de polímeros sintéticos no meio ambiente, embalagens de alimentos entre outros, despertam interesse no estudo do desenvolvimento de filmes biodegradáveis que possam atuar como embalagens ou como componente das mesmas. Entre os biopolímeros naturais mais utilizados para obtenção do filme, estão os polissacarídeos e as proteínas, são provenientes de fontes renováveis e são capazes de formar uma matriz contínua e coesa. Dentre as diversas fontes renováveis, destaca-se o pescado. O objetivo foi utilizar subprodutos do processamento de pescada amarela para extrair proteínas miofibrilares a partir da carne mecanicamente separada (CMS) para posterior obtenção do filme biodegradável. A proteína miofibrilar foi extraída da pescada amarela e posteriormente liofilizada. Executou-se um planejamento fracionário Plackett Burman, um Planejamento Composto Central Rotacional (PCCR) e a função desejabilidade para a otimização da obtenção do filme, em que as variáveis dependentes foram permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração (RT) e alongação (E) e as variáveis independentes foram concentrações de proteínas (C_p), de plastificantes (C_{pl}), tempo (t_b) e temperatura do banho-maria (T_b), tempo (t_s) e temperatura (T_s) de secagem do filme, quantidade de solução filmogênica (Q_{sf}). O planejamento fracionário mostrou que as variáveis independentes significativas foram: C_p , C_{pl} e T_s . Onde estas variáveis foram analisadas através do planejamento completo (PCCR), obtendo assim, os gráficos de superfície de repostas e posteriormente a otimização, através da função desejabilidade, obteve-se valor global igual 0,995, utilizando os fatores C_p , C_{pl} e T_s em 1,13%, 35,96% e 25,96°C, respectivamente. Nessas condições, os valores preditos de PVA, RT e E foram encontrados, sendo os valores experimentalmente encontrados superiores aos valores desejáveis pela função desejabilidade, ratificando que os modelos representaram de forma adequada as respostas estudadas no processo de obtenção do filme.

Palavras-chave: permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e porcentagem de alongação.

ABSTRACT

The environmental problems caused by disposal of synthetic polymers in the environment, food packaging and the others, arouse interest in the study of the development of biodegradable films which may serve as packaging or as a component thereof. Among the most commonly used natural biopolymers for obtaining the film, are polysaccharides and proteins, they are derived from renewable sources and are capable of forming a continuous and cohesive matrix. Among the various renewable sources, it highlights the fish. The goal was to use the byproducts of processed pescada amarela to extract myofibrillar proteins from the mechanically recovered meat (MRM) to be retrieved later the biodegradable film. The myofibrillar protein was extracted from the pescada amarela and subsequently lyophilized. Performed a fractional plan Plackett Burman, a rotational central composite design and the desirability function for obtaining optimization of the film, in which the dependent variables were permeability to water vapor (PVA), tensile strength (RT) and elongation (E) and the independent variables were protein concentrations (C_p), plasticizers (C_{pl}), time (t_b) and temperature of the water bath (T_b), time (T_s) and temperature (T_s) of drying film, amount of filmogenic solution (Q_{sf}). Fractional planning showed that significant independent variables were: C_p , C_{pl} and T_s . Where these variables were analyzed through the full planning (PCCR), so obtaining the responses of surface charts and then the optimization through the desirability function, it obtained overall value of 0,995, using C_p , C_{pl} and T_s factors in 1,13%, 35,96% and 25,96 °C respectively. Under these conditions, the predicted values of PVA, RT and E were found, and the values found experimentally higher than the values desired by the desirability function, confirming that the models represented adequately studied the responses of obtaining the film process.

Keywords: permeability to water vapor, tensile strength and elongation percentage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>)	14
Figura 2 - Estrutura química do sorbitol.....	20
Figura 3 - Molécula de glicerol.....	21
Figura 4 - Microfotografia da proteína miofibrilar liofilizada de pescada amarela. Ampliação de 100X(A) e 882X(B).....	39
Figura 5 - Filme biodegradável obtido de proteína miofibrilar de pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>).....	41
Figura 6 - Efeito da concentração de proteína e plastificante na formação do filme sobre a permeabilidade ao vapor de água.....	51
Figura 7 - Efeito da concentração de plastificante e temperatura de secagem na formação do filme sobre a permeabilidade ao vapor de água..	52
Figura 8 - Efeito da concentração de plastificante e temperatura na formação do filme sobre a resistência à tração.....	53
Figura 9 - Efeito da concentração de proteína e plastificante na formação do filme sobre a elongação.....	55
Figura 10 - Perfis de valores preditos e desejabilidade para as respostas PVA, RT e E, respectivamente.....	56
Figura 11 - Foto mostrando a transparência do filme otimizado.....	62
Figura 12 - Micrografias de superfície (A e B) e a seção transversal (C e D) do filme otimizado. Ampliação: 750 e 5000X para superfície e corte transversal.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores reais das variáveis independentes do planejamento experimental fracionário Plackett-Burman e seus respectivos níveis codificados.....	30
Tabela 2 - Definição dos níveis das três variáveis estudadas no processo de obtenção do filme a partir de pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>) no DCCR 2 ³	33
Tabela 3 - Condições de desejabilidade (d_i) das variáveis respostas durante a otimização da produção dos filmes.....	34
Tabela 4 – Composição centesimal da PML.....	37
Tabela 5 - Perfil de aminoácidos totais presentes na proteína miofibrilar liofilizada (PML) da pescada amarela (g/100g de proteína).....	39
Tabela 6 - Delineamento Plackett Burman das variáveis independentes (com níveis codificados) e as respectivas respostas como PVA, RT e E.....	42
Tabela 7 - Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e a significância estatística, no delineamento PB para Permeabilidade ao Vapor de Água....	42
Tabela 8 - Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e a significância estatística, no delineamento PB para Resistência à Tração.....	43
Tabela 9 - Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e a significância estatística, no delineamento PB para Elongação.....	43
Tabela 10 - Matriz codificada do planejamento experimental 23 para a otimização da obtenção do filme da pele da pescada amarela.....	45
Tabela 11 - Estimativa dos coeficientes das variáveis de polinômios de segunda ordem (eq. 5) associada à significância para cada resposta estudada.....	47
Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) para a PVA, RT e E dos filmes.	48
Tabela 13 - Modelo reduzido para PVA, RT e E em função das variáveis independentes, teste F e R^2	50
Tabela 14 – Respostas previstas obtidas para cada variável dependente referente à desejabilidade.....	58
Tabela 15 – Cor do filme otimizado.....	59
Tabela 16 – A transmissão de luz e a transparência do filme otimizado.....	60

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Produção PML (%)	28
Equação 2 - Permeabilidade ao vapor de água dos filmes do planejamento Plackett Burman.....	31
Equação 3 - Resistência à tração dos filmes do planejamento Plackett Burman.....	31
Equação 4 - Elongação na ruptura dos filmes do planejamento Plackett Burman.....	32
Equação 5 – Modelo polinomial do delineamento composto central rotacional.....	32
Equação 6 - Cor do filme otimizado.....	35
Equação 7 – valor de transparência do filme otimizado.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 PESCADA AMARELA (<i>Cynoscion acoupa</i>).....	14
3.2 SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DO PESCADO.....	15
3.3 EMBALAGENS PARA ALIMENTOS.....	17
3.4 PLASTIFICANTES.....	20
3.5 PROTEÍNAS DO PESCADO	22
3.5.1 Proteínas Miofibrilares.....	23
3.5.2 Proteínas Sarcoplasmáticas.....	25
3.5.3 Proteínas do Estroma.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA.....	27
4.2. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML).....	27
4.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML).....	28
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML).....	28
4.4.1 Composição Centesimal da PML.....	28
4.4.2 Caracterização da microestrutura das PML (MEV).....	28
4.4.3 Determinação da composição de aminoácidos da PML.....	28
4.5 PREPARAÇÃO DOS FILMES.....	29
4.6 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO PLACKETT BURMAN (PB).....	29
4.6.1 variáveis independentes	30
4.6.2 variáveis dependentes.....	31
4.6.2.1 Propriedade de barreira dos filmes.....	31
4.6.2.2 Propriedades mecânicas dos filmes (resistência à tração e alongação).....	31

4.7 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)....	32
4.8 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO: FUNÇÃO DESEJABILIDADE.....	33
4.9 CARACTERIZAÇÃO DO FILME OTIMIZADO.....	34
4.9.1 Espessura e solubilidade do filme otimizado.....	34
4.9.2 Cor do filme otimizado.....	35
4.9.3 A transmissão da luz e valor de transparência do filme otimizado.....	35
4.9.4 Caracterização da microestrutura do filme otimizado (MEV).....	35
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 RENDIMENTO DA PROTEÍNA MIOFIBRILAR LIOFILIZADA (PML)....	36
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML).....	37
5.2.1 Composição Centesimal da PML.....	37
5.2.2 Caracterização da microestrutura da PML (MEV).....	38
5.2.3 Perfil de aminoácidos.....	39
5.3 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO PLACKETT BURMAN (PB)	41
5.4 PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (PCCR)....	45
5.4.1 Condições para a otimização dos filmes.....	45
5.4.2 Estimativa dos efeitos dos modelos.....	46
5.4.3 Gráficos de superfície de resposta.....	50
5.5 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS FILMES PELA FUNÇÃO DESEJABILIDADE	56
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO FILME OTIMIZADO.....	58
5.6.1 Espessura e solubilidade do filme otimizado.....	58
5.6.2 Cor do filme otimizado.....	59
5.6.3 A transmissão da luz e valor de transparência do filme otimizado.....	60
5.6.4 Caracterização da microestrutura do filme otimizado (MEV).....	62
6 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais causados pelo descarte de polímeros sintéticos no meio ambiente, embalagens de alimentos entre outros, despertam interesse no estudo do desenvolvimento de filmes biodegradáveis que possam atuar como embalagens ou como componente das mesmas (FERREIRA et al., 2009). A poluição ambiental causada pela deposição de materiais de embalagem não renováveis no meio ambiente demanda alternativas para seu controle e ou eliminação. Assim, surgiu o interesse em desenvolver biofilmes com características de embalagens biodegradáveis, que não causem danos ao meio ambiente e que adicionalmente possam melhorar a qualidade dos produtos alimentícios (DAVANÇO et al., 2007).

Os componentes dos filmes biodegradáveis estão divididos em três categorias: hidrocolóides, lipídeos e compósitos. Os hidrocolóides incluem proteínas (da soja, do soro do leite, do milho, do amendoim, glúten do trigo e colágeno, entre outras) e polissacarídeos (amido, alginatos, celulose e derivados, quitosana e agar, entre outros). Os lipídeos englobam ceras, acilgliceróis e ácidos graxos e os compósitos contêm tanto hidrocolóides como lipídeos (CHA e CHINNAM, 2004).

Os filmes biodegradáveis destinam-se a auxiliar a manutenção da qualidade e a vida útil dos alimentos, controlando a transferência de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, entre outros (SHAW et al., 2002). Contribuem para prolongar a vida de prateleira e para melhorar a qualidade de alimentos, proporcionando uma barreira à transferência de massa, levando ingredientes alimentares e/ou melhorar a integridade mecânica ou as características de manuseio do produto (PÉREZ-GAGO E KROCHTA, 2000; BOURTOOM, 2008). Já as embalagens de plásticos sintéticos apresentam dois sérios problemas. Primeiro, por estas embalagens possuírem tempo de uso curto e vir a perder rapidamente. E segundo, a quantidade de resíduos de embalagens de plástico, que não são biodegradáveis e persistem no ambiente por um longo período de tempo (IMAM et al., 2005; MATHEW E ABRAHAM, 2008).

Entre os biopolímeros naturais mais utilizados para obtenção do filme, estão os polissacarídeos e as proteínas, os quais apresentam algumas vantagens, pois são provenientes de fontes renováveis e são capazes de

formar uma matriz contínua e coesa (RHIM e NG, 2007). Dentre as diversas fontes renováveis, destaca-se o pescado (SOBRAL, 2000).

As proteínas possuem uma estrutura com 20 monômeros diferentes, o que confere uma ampla gama de propriedades funcionais, especialmente um potencial para ligações intermoleculares. Filmes à base de proteínas podem formar ligações em posições diferentes e oferecem grande potencial para a formação de numerosas ligações (Ou et al., 2005).

Os filmes à base de proteínas de pescado formam redes, apresentando boas propriedades mecânicas, como plasticidade e elasticidade, e boa barreira ao oxigênio, porém, absorvem muita água, devido à hidrofiliabilidade dos aminoácidos das moléculas de proteína (PAIVA et al., 2006). Esta característica pode ser modificada pela adição de plastificantes hidrofóbicos e/ou aditivos (ZAVAREZE et al., 2012). Estas afirmações são, também, reportadas por Limpan, et al. (2010), onde afirmam que as proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas de peixes vêm sendo pesquisadas para a formação de filmes.

Pesquisas realizadas com proteínas miofibrilares de pescado foram reportadas por: Cortez-Veja et al. (2013), que utilizaram proteínas miofibrilares de sardinha (*Sardina pilchardus*), e demonstraram sua capacidade de formar filmes transparentes e bastante resistentes; Monterrey-Quintero e Sobral (2000), trabalhando com proteínas miofibrilares liofilizadas (PML) de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), demonstraram que a amostra de PML, apresentou uma região de máxima solubilidade (96,9%) e os biofilmes à base das PML de tilápia-do-nilo são pouco solúveis (abaixo de 20 g/100 g matéria seca); Zavareze et al. (2012), elaboraram filmes utilizando pescado de baixo valor comercial, a corvina (*Micropogonias furnieri*) e demonstraram que filmes elaborados com maior concentração de proteínas miofibrilares são mais espessos e opacos. Apresentando, ainda, mais resistência à tração e menor flexibilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar subprodutos do processamento de pescada amarela para extrair proteínas miofibrilares a partir da carne mecanicamente separada (CMS) para posterior obtenção do filme biodegradável.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as proteínas miofibrilares extraídas;
- Verificar a influência das diferentes concentrações de proteínas miofibrilares liofilizadas, de plastificantes, tempo e temperatura do banho, temperatura e tempo de secagem do filme, quantidade de solução filmogênica na obtenção dos filmes biodegradáveis;
- Determinar a propriedade de barreira (permeabilidade ao vapor de água) dos filmes;
- Verificar a resistência mecânica através da resistência à tração e alongação na ruptura dos filmes;
- Caracterizar as propriedades físicas como espessura, solubilidade, cor, transparência e a microestrutura do filme otimizado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa*)

A pescada amarela (Figura 1), *Cynoscion acoupa*, é uma espécie demersal, pertencente à família Sciaenidae, que ocorre em águas rasas tropicais e subtropicais da costa atlântica da América do Sul, apresentando tolerância para as águas salobras (MOURÃO, et al., 2009) e no Brasil ocorre em todo o litoral. Esta espécie é nectônica, demersal e costeira de águas rasas; comum nas águas salobras dos estuários, lagoas estuarinas, desembocaduras dos rios e podem penetrar na água doce. Os espécimes juvenis são restritos às águas salobras e doces, e encontradas em pequenos e grandes cardumes nadando próximo ao fundo (MATOS e LUCENA, 2006).

Figura 1 - Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).



Fonte: MOURÃO (2007).

Segundo Matos e Lucena (2006) a pescada amarela se aproxima de águas mais rasas à noite para se alimentar de peixes e crustáceos, e durante o dia é pouco ativa. Reproduz-se na primavera e verão e as larvas se desenvolvem em águas rasas e de baixa salinidade (MATOS e LUCENA, 2006).

A pescada amarela é um dos principais recursos explorados na costa norte do Brasil e representa 19% dos desembarques do Estado do Pará. A captura da pescada amarela ocorre o ano todo, entretanto são intensificadas no mês de maio estendendo-se até dezembro, período de transição chuvoso-seco (maio a junho) e seco propriamente dito (julho a dezembro) (MOURÃO, 2007).

O sistema da pescada amarela é considerado como artesanal de média escala (ISAAC et al., 2009), não possuindo medidas específicas de ordenamento para limitar ou controlar o esforço pesqueiro. Os estudos realizados por Souza et al. (2003) demonstraram que, considerando os Estados do Pará e Maranhão conjuntamente, o estoque estaria no seu limite máximo de exploração. Neste sentido, considerando a importância sócio-econômica da espécie, seu estado de exploração e a ausência de medidas de ordenamento, sugere-se que esta pescaria deva ser imediatamente regulamentada.

A espécie *Cynoscion acoupa* possui grande valor comercial na região Norte do Brasil e é o principal pescado consumido nas cidades do litoral maranhense com elevado valor comercial. As bexigas natatórias são obtidas como subproduto, e atingem altos valores. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre a espécie e funcionamento do sistema na região (ALMEIDA et. al., 2009).

3.2 SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DO PESCADO

Os subprodutos e sobras do processamento de alimentos apresentam valor relativamente baixo. No caso do pescado, o material residual pode ser constituído de carne escura, peixes fora do tamanho ideal para consumo, resíduos obtidos na filetagem ou outros processamentos como cabeça, carcaças, fígado, pele e vísceras (VISENTAINER et al., 2003).

Em virtude do grande volume de captura e dos métodos de processamento utilizados, uma quantidade considerável da produção pesqueira acaba como subproduto, uma vez que grande parte das indústrias aproveita apenas o filé do peixe e/ou o que chamam de “corpo limpo”; que é caracterizado como um exemplar sem a cabeça, vísceras, nadadeiras e escamas (SOUZA; INHAMUNS, 2011).

Os subprodutos da indústria de pescado apresentam uma composição rica em compostos orgânicos e inorgânicos, o que gera preocupação relativa aos potenciais impactos ambientais negativos decorrentes da disposição deste material diretamente no ambiente ou oferecido *in natura* aos peixes cultivados (HENRY-SILVA e CAMARGO, 2002; SEIBEL e SOARES, 2003).

Na etapa de filetagem, o aproveitamento do peixe capturado é de apenas 30% de rendimento, os outros 70% da matéria-prima são subprodutos (BUENO et al., 2011). Esse grande volume de material que não é utilizado pode ser utilizado como fonte de proteínas ou lipídeos, uma vez que podem ser aproveitados como fonte de proteínas. O aproveitamento desses subprodutos diminui o impacto ambiental, aliado ao valor agregado que pode ser conferido ao material, até então, subutilizado ou desperdiçado (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2007).

Os subprodutos sólidos do beneficiamento do pescado são destinados principalmente à alimentação animal, mas também podem ser aproveitados para a produção de alimentos para consumo humano. O valor nutricional desses subprodutos, ricos em proteínas e em ácidos graxos da série ômega-3, incentiva o desenvolvimento de produtos para a alimentação humana (MIRANDA et al., 2003).

O uso de tecnologias para o aproveitamento dos subprodutos do beneficiamento do pescado, no desenvolvimento de produtos para a alimentação humana, aumenta a capacidade da indústria da pesca de responder não só à demanda por produtos diferenciados, mas também à tendência da busca por alimentos saudáveis e com alto valor nutritivo, suprimindo as necessidades nutricionais – em especial, de proteínas animais, pelos setores mais carentes da população, por um preço acessível (MIRANDA et al., 2003).

Segundo a Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000 (BRASIL, 2000), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, entende-se por Carne Mecanicamente Separada (CMS), a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada a elaboração de produtos cárneos específicos. O produto será designado carne mecanicamente separada, seguido do nome da espécie animal que o caracterize. Onde serão utilizados unicamente ossos, carcaças ou partes de carcaças ou partes de carcaças de animais de açougue, que tenham sido aprovados para consumo humano pelo Serviço de Inspeção Federal, não podendo ser utilizadas cabeças, pés e patas. Sendo obrigatório em sua composição carne.

De acordo com o Codex Alimentarius, a carne mecanicamente separada (CMS) de pescado é um produto obtido a partir de uma única espécie, ou mistura de espécies de peixe com características sensoriais similares, através do processo de separação mecanizada da parte comestível, gerando partículas de músculo esquelético isentas de vísceras, escamas, ossos e pele (FAO, 1994).

Segundo Kotaki (2005), a remoção da carne residual na carcaça de peixe (entende-se por carcaça, a coluna vertebral contendo espinhas, costelas e barriga) através de separadores mecânicos é uma alternativa ao reaproveitamento de resíduos de pescado, que permitiria minimizar os problemas de poluição ambiental e reduzir o custo unitário das matérias-primas.

A produção de CMS em larga escala permite a elaboração de produtos de alto valor agregado, que possam atingir determinados segmentos do mercado, ou, mesmo quando transformados em produtos mais simples, atender à necessidade social de demanda por proteína de origem animal de primeira qualidade (KUHN e SOARES, 2002).

A utilização da CMS para obtenção do concentrado proteico do pescado apresenta-se como uma boa alternativa de aproveitamento deste subproduto do beneficiamento do pescado, originando um produto rico em proteína que poderá ser utilizado para enriquecimento de uma infinidade de alimentos (REBOUÇAS, et al., 2012). Como por exemplo, a obtenção de filmes biodegradáveis a partir das proteínas miofibrilares obtidas do resíduo do pescado.

3.3 EMBALAGENS PARA ALIMENTOS: BIOFILMES

Há constante desafio visando atender às exigências dos consumidores, fornecendo embalagens práticas que preservem os alimentos e seja viável ambiental e economicamente (SOARES, 2009).

São funções das embalagens, melhorar a apresentação de um produto, através das características expostas nas mesmas; facilitar o transporte e o acesso ao produto; trazer informações ao consumidor; além de aumentar o valor agregado ao produto. Essencialmente, sabe-se que a principal finalidade

das embalagens é proteger os alimentos contra qualquer tipo de ação de deterioração, sejam elas de natureza química, física ou microbiológica, desde o acondicionamento até o consumo final, assegurando a manutenção de suas próprias características, por um período de tempo mais longo, após seu processamento (SOUSA et al., 2012).

Embora as embalagens tradicionais tenham contribuído grandemente com os primeiros desenvolvimentos do sistema de distribuição de alimentos, elas não são suficientes para atender às novas exigências dos consumidores por produtos mais próximos ao natural, contendo menos conservantes e que sejam seguros (YAM et al., 2005). Neste sentido, novas tecnologias de embalagens vêm sendo desenvolvidas em resposta a essa demanda (DAINELLI et al., 2008).

A maioria dos biofilmes é constituída de plásticos biodegradáveis obtidos a partir de materiais de fonte renovável, que agem como barreira a elementos externos e podem proteger os produtos embalados de danos físicos e biológicos, assim como impedir a volatilização de compostos e a perda de umidade, aumentando a vida útil do produto. (BAE et al., 2009; PAIVA et al., 2006; RHIM e NG, 2007).

Entre os biopolímeros naturais mais utilizados, estão os polissacarídeos e as proteínas, os quais apresentam algumas vantagens, pois são provenientes de fontes renováveis e são capazes de formar uma matriz contínua e coesa (RHIM e NG, 2007). Portanto, desempenham um papel significativo para resolver os problemas ambientais provocados pelo uso de materiais poliméricos sintéticos (CORTEZ-VEGA, et al., 2013).

Para se proceder à formulação dos filmes, é necessário usar pelo menos um componente que seja capaz de formar uma matriz estrutural suficientemente coesa. Apenas polímeros com elevada massa molecular, devido à sua capacidade de coesão, podem dar origem a filmes com uma estrutura deste tipo. O grau de coesão da matriz polimérica afeta as propriedades dos filmes, tais como, densidade e compatibilidade, porosidade e permeabilidade, flexibilidade e rigidez. A maior parte dos biopolímeros naturais podem ser usados para a preparação de filmes (RHIM e NG, 2007).

O desenvolvimento de filmes biodegradáveis para o envolvimento de alimentos exige o conhecimento das propriedades de barreira dos mesmos.

Deste modo, é necessário considerar a permeabilidade dos filmes ao vapor de água, aromas, solutos e lipídeos. É ainda de salientar que a adição de agentes plastificantes aos polímeros provoca alterações nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes (ROBERTSON, 2006).

Os biofilmes podem ser utilizados como revestimentos que são aplicados sobre a superfície do alimento ou entre os componentes que são aplicados sobre a superfície do alimento ou entre os componentes, visando a redução na perda de vapor de água, oxigênio, migração de lipídios e aroma ou para estabilizar os gradientes de atividade de água e assim manter as diferentes propriedades de textura (GIANCONE, et al., 2008).

A seguir, encontram-se referidas algumas propriedades funcionais dos filmes em questão (THARANATHAN, 2003):

- Promovem a redução da taxa de absorção de oxigênio do alimento (respiração lenta, mas controlada);
- Constituem uma barreira seletiva para os gases (p.ex., oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água);
- Criam uma atmosfera modificada relativamente à composição interna de gases podendo, p.ex. regular o processo de amadurecimento e, consequentemente, aumentar o tempo de vida de determinado alimento;
- Atenuam a migração de lipídeos (usados na indústria alimentar);
- Servem como veículo de incorporação de aditivos alimentares (aromas, corantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos);
- Previnem ou reduzem o desenvolvimento de microrganismos durante o armazenamento.

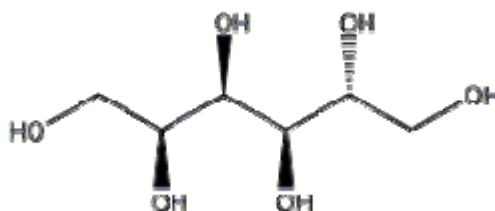
A formação de filmes necessita de, um biopolímero, para promover a matriz estrutural e de um plastificante, de baixa massa molecular para aumentar a flexibilidade do mesmo (SHAW et al., 2002).

3.4 PLASTIFICANTES

Plastificantes geralmente são moléculas de baixa massa molar e são compostos que podem ser adicionados em filmes poliméricos cuja intenção é melhorar a processabilidade e aumentar a flexibilidade. Estas moléculas interagem com as cadeias poliméricas através de forças intra e intermoleculares (ligações de hidrogênio), diminuem a rigidez do filme e reduzem a viscosidade do sistema. Mesmo alterando as propriedades físico-químicas dos polímeros, os plastificantes não alteram a estrutura do material, no entanto, eles possibilitam o aumento do volume livre das cadeias poliméricas, e em consequência, a mobilidade de macromoléculas (OLIVAS e BARBOSA-CÁNOVAS, 2007; SOTHORNVIT e KROCHTA, 2001).

O sorbitol (Figura 2) é um poliálcool extraído de frutas como ameixa e maçã. É um composto de baixa massa molar, muito utilizado como plastificante. A presença de seis grupos hidroxilas possibilita a sua interação através de ligações de hidrogênio (LIMA, et al., 2007).

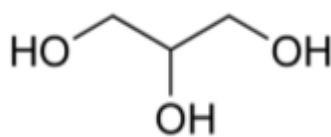
Figura 2 - Estrutura química do sorbitol.



Fonte: Lima et al., (2007).

Plastificantes como glicerol e sorbitol são substâncias não voláteis, que quando adicionados ao material do filme alteram suas propriedades mecânicas e físicas. A estrutura, composição, massa molecular e grupos funcionais dos plastificantes podem afetar o grau de plasticidade dos filmes biopoliméricos (CAO et al., 2009). A Figura 3 mostra a molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol), um álcool simples, sendo este um dos plastificantes mais utilizados em filmes comestíveis (LAOHAKUNJIT e NOOMHORM, 2004).

Figura 3 - Molécula de glicerol.



Fonte: Chaplin (2009).

Plastificantes alteram a flexibilidade dos filmes devido à habilidade em reduzir as pontes de hidrogênio entre as cadeias dos polímeros e interferir no espaço molecular (MALI e GROSSMANN, 2003).

Os filmes biodegradáveis são barreiras fracas para o vapor de água, comparativamente aos polímeros sintéticos. É ainda de notar que quanto maior for a quantidade de plastificante adicionada ao polímero, menor será a permeabilidade ao vapor de água, conferindo melhor proteção relativamente ao vapor de água. Por outro lado, a presença do plastificante provoca a diminuição da capacidade dos filmes para atuarem como barreiras eficazes para o oxigênio, aromas e lipídeos (GENNADIOS, 2002).

As propriedades mecânicas são altamente influenciadas pelos plastificantes, pois a fragilidade é uma característica inerente atribuída ao complexo: estruturas ramificadas e forças intermoleculares fracas. Os plastificantes, ao reduzirem as forças intermoleculares, reduzem a rigidez da estrutura da película e aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas, melhorando assim as propriedades mecânicas (SRINIVASA et al., 2007).

Os plastificantes, para que possam ser utilizados em composição com um dado polímero, devem possuir boas características de desempenho, tais como: baixa volatilidade; estabilidade à luz e ao calor; manutenção das propriedades, mesmo a baixas temperaturas; baixa toxidez; resistência química à ação de solventes; resistência à exsudação e à migração para outros materiais. Destas, a característica de permanência na matriz é a mais importante, principalmente quando a mistura é empregada para o acondicionamento de alimentos, para a confecção de bolsas de sangue e para a fabricação de brinquedos, dentre outras (FERRUTI et al., 2003; LAKSHMI e JAYAKRISHNAN, 2002).

3.5 PROTEÍNAS DO PESCADO

Os peixes são uma fonte de proteína rica em aminoácidos essenciais (lisina, metionina, cistina, treonina e triptofano). As proteínas do músculo de peixe são constituídas por vários grupos de proteínas: a fração que forma a sarcoplasmática, que desempenha as funções bioquímicas nas células; proteínas miofibrilares do sistema contrátil; e proteínas do tecido conjuntivo (proteínas do estroma), o principal responsável pela integridade dos músculos. Para além das suas propriedades funcionais, tecnológicas e nutricionais, algumas proteínas de peixe podem apresentar atividade antioxidante, a qual está associada com certos peptídeos bioativos presentes nas sequências proteicas (ZAVAREZE et al., 2012).

As proteínas musculares do peixe possuem elevado valor biológico, com uma composição balanceada em aminoácidos, particularmente aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (Neves et al., 2004). Os peixes e os produtos obtidos por meio da atividade da pesca destacam-se nutricionalmente de outros alimentos de origem animal, pois as proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais para o ser humano. Adicionalmente, são excelentes fontes de aminoácidos lisina, metionina e cisteína, encontrados em baixa quantidade em dietas a base de grãos de cereais (ABABOUC, 2005).

De maneira geral, as características das carnes de pescado são similares às da carne dos animais de abate. Comparando-se com as proteínas musculares dos mamíferos terrestres como a carne bovina (39 a 68% proteína miofibrilar, 16 a 28% proteína sarcoplasmática e 16 a 28% proteínas estromáticas (PARK e LIN, 2005).

Os subprodutos gerados no processamento do pescado, ricos em proteínas e lipídeos são freqüentemente subaproveitados. O uso de tecnologias convencionais para processar o pescado e criar valor acrescentado aos produtos de pescado geralmente leva a uma utilização limitada do animal. Muitos subprodutos ricos em proteína e lipídeos são perdidos e deste modo não são recuperados para o uso humano (KRISTINSSON e RASCO, 2002).

As propriedades funcionais típicas das proteínas de sistemas alimentares são as seguintes (DAMODARAN, 1997): solubilidade, capacidade

de retenção de água, viscosidade, capacidade de gelificação, propriedades emulsionantes, capacidade de formação de espuma, retenção de aromas, absorção de gordura, coesão-adesão e a elasticidade.

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

3.5.1 Proteínas Miofibrilares

Proteínas miofibrilares (PM) têm uma função importante no processamento dos produtos em gel. PM influenciam o lipídeo/retenção de água, o rendimento, a textura e a coesão do produto final de gel (FOEGEDING et al., 2006). A PM contém a miosina, a actina, a actomiosina, tropomiosina e troponina e pode formar uma rede tridimensional através de desdobramento (exposição de partes hidrofóbicos), a agregação e a ligação cruzada durante o processo de indução de calor (XU et al., 2011). Além disso, as PM afetam as propriedades de emulsificação e os comportamentos reológicos de produtos à base de carne triturados (SUN et al., 2012).

Formação de géis de proteínas musculares em alimentos processados é muito importante, influencia a textura e características sensoriais dos produtos finais. Proteínas miofibrilares, contribuindo para 55-65% da proteína total do músculo, ou 12% do peso do músculo esquelético, são excelentes agentes gelificantes que são em grande parte responsáveis pelas características texturais e estruturais de produtos à base de carne (ACTON et al., 1982).

O foco maior é sobre a forma como a miosina e actina em diferentes espécies de animais reagem, e como as propriedades físico-químicas, as interações das proteínas miofibrilares com outros aditivos, influencia na textura do gel e propriedades reológicas da proteína em si (SUN e HOLLEY, 2011).

As proteínas miofibrilares são normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH da solução (ZAVAREZE et al., 2012). Essas proteínas, que são completamente estendidas, apresentam cadeias de polipeptídeos fortemente associadas entre si, em estruturas paralelas (IWATA et al., 2000). Em razão disso, essas proteínas são capazes de formar uma matriz contínua durante a secagem da solução (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000).

As proteínas miofibrilares são proteínas soluções salinas e podem ser extraídas com solução de Cloreto de Potássio (KCl) a uma concentração igual ou superior a 0,5 M. A miosina e a actina, que constituem $\frac{3}{4}$ do total de proteínas miofibrilares, são as proteínas contráteis, responsáveis pela contração e relaxamento. Essas proteínas têm a capacidade de formar géis sob determinadas condições, em um processo que envolve desnaturação parcial seguida de agregação, devida a associações moleculares (VAZ, 2005).

A estrutura das proteínas miofibrilares varia com a força iônica (OFFER e TRINICK, 1983). Além disso, entre todos os fatores que afetam propriedades de gelificação de proteínas miofibrilares, a força iônica tem sido considerada altamente importante (Xiong et al., 2000). Além disso, há evidências de que o sal promove a oxidação de proteínas miofibrilares, bem como o tecido muscular (Liu et al., 2011). A oxidação em altas concentrações de sal também pode melhorar significativamente a transglutaminase microbiana (MTGase) mediada por gelificação de proteínas miofibrilares (Li et al., 2013).

Segundo Vaz (2005), quando a miofibrila é dissolvida pela solução salina, forma-se uma solução pastosa de actomiosina, condição para que possa haver formação de elasticidade. Assim, neste caso, a função do sal é a de agente peptizante da miofibrila. A concentração mínima de sal que começa a dissolver a miofibrila é de 0,3M (1,4% de sal para uma carne contendo 80% de umidade) a 0,4 M (1,9% de sal para 80% de umidade) para dissolvê-la totalmente. Abaixo desse nível (2%) não se forma um solução de actomiosina. Por outro lado, uma quantidade de NaCl acima de 3% torna-se limitante por comprometer o paladar do produto, definindo-se assim a concentração ideal de sal entre 2 a 3%.

O processo de lavagem pode remover as proteínas de baixo peso molecular tal como as proteínas sarcoplasmáticas, levando ao aumento da

concentração de proteínas miofibrilares que desempenham um papel essencial na formação de uma forte rede de película. Proteína Sarcoplasmática poderia inserir entre cadeias de proteínas miofibrilares durante a formação do filme, levando à diminuição da interação entre miofibrilas. A formação do filme ocorre geralmente através do desenvolvimento de uma rede tridimensional de moléculas de proteína por iônica, hidrogênio, hidrofóbico, e pontes dissulfeto (HAMAGUCHI, WENG, & TANAKA, 2007).

3.5.2 Proteínas Sarcoplasmáticas

As proteínas sarcoplasmáticas são proteínas solúveis do sarcoplasma, ao qual pertencem a maioria das enzimas da via glicolítica, creatina quinase e mioglobina. Uma mistura de várias centenas de proteínas globulares de peso molecular relativamente baixo é conhecida por estar presente na fração sarcoplasmática (BENDIXEN, 2005; TORNBERG, 2005).

Proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em água ou solução de baixa força iônica. Estes componentes são normalmente lavados para fora do processamento. No processo de lavagem, uma grande quantidade de água é usada e grandes quantidades de água lavada são geradas como resíduo, que contém as proteínas sarcoplasmáticas (HEMUNG e CHIN, 2013). Representam 25-30% das proteínas musculares dos peixes. Eles são facilmente acessíveis, e compreendem os péptidos e proteínas de até aproximadamente 200 kDa de peso molecular. Hidrolisados de proteínas de peixe têm sido mostrados para compreender as propriedades bioativas (HIMAYA et al., 2012; PILON et al., 2011; EWART et al., 2009).

Apesar de responsável por cerca de 30% da proteína total do músculo, o papel das proteínas sarcoplasmáticas sobre as propriedades funcionais da carne tem recebido menos atenção em relação às proteínas miofibrilares (MIYAGUCHI, NAGAYAMA e TSUTSUMI, 2000).

As proteínas sarcoplasmáticas são proteínas globulares que, geralmente, têm que ser desnaturadas termicamente para formar uma matriz contínua (IWATA et al., 2000). 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 e KROCHTA, 2001).

Ohlendieck (2010) relata que a alteração da fração sarcoplasmática não está diretamente envolvida na sensibilidade muscular, porque as proteínas sarcoplasmáticas têm funções estruturais, apesar de estudos em porco relatado que a desnaturação de proteínas sarcoplasmáticas tem um impacto sobre os parâmetros de qualidade da carne, como cor e capacidade de retenção de água (JOO et al., 1999; SAYD et al., 2006).

Kotaki (2005) destacou algumas propriedades tecnológicas e nutricionais das proteínas sarcoplasmáticas, tais como: a capacidade dessas provocarem alterações nas proteínas miofibrilares e estromáticas; quanto ao valor nutritivo não são consideradas inferiores às proteínas miofibrilares; a diversificação da sua composição qualitativa e quantitativa pode servir para a identificação de diferentes espécies de peixes, usando o método eletroforético.

3.5.3 Proteínas do Estroma

As proteínas do estroma (tecido conectivo) – o colágeno e a elastina – são o resíduo da extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (ZAVAREZE et al., 2012). Sua composição é de aproximadamente 2 a 5 % em músculo de pescado (SILVA, 2006).

Elas são proteínas fibrosas e insolúveis. A elastina possui uma poliestrutura estável e mesmo com forte aquecimento mantém sua estrutura estável e insolúvel. O colágeno possui forte estabilidade a baixas temperaturas, mas acima de determinadas temperaturas de aquecimento ocorrem grandes mudanças na sua estrutura, tornando-se solúvel em água. A temperatura de contração térmica T_s para o colágeno de pescado varia de 30 a 60 °C. A T_s é a temperatura na qual ocorre um brusco desdobramento das três cadeias das hélices do colágeno, tornando-se a fibra contraída na forma de espiral irregular (SILVA, 2006).

Kotaki (2005) enumerou as seguintes funções e propriedades nutricionais e tecnológicas das proteínas do estroma: servem de sustentação das fibras musculares; devido ao baixo teor dessas proteínas, o pescado, em

geral, é considerado tenro e de fácil digestão; por serem pobres em aminoácidos essenciais essas proteínas podem ser consideradas de baixo valor nutricional; quantidades variáveis e diferentes tipos de colágenos em diferentes peixes podem ter influência nas propriedades relacionadas à textura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

Para a elaboração dos filmes biodegradáveis foi utilizado como matéria-prima resíduos de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), oriundos da empresa Costa Norte Comércio de Pescados Ltda-Icoaraci/PA. Os subprodutos foram embalados, acondicionados em caixas térmica com gelo e transportados para o Laboratório de Tecnologia de Pescados e Carnes (LAPOA) da Universidade Federal do Pará. No laboratório foram lavados em água clorada (5 ppm) a 4°C/5 min., em seguida foram lavados com água destilada para retirada do excesso de cloro, acondicionados em embalagens plásticas e armazenados em freezer a -18 °C.

4.2. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML)

Para a obtenção das proteínas miofibrilares liofilizadas, foi utilizada a metodologia de Zavareze et al. (2012) com modificações, onde os autores trabalharam com a proteína não liofilizada. Os subprodutos obtidos a partir da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) foram triturados, de modo a facilitar a homogeneização. Em seguida foram misturados com três volumes de água destilada fria (4 °C) e homogeneizado em uma centrífuga (Heraeus/multifuge X1R centrifuge) a 10.000 rpm durante 2 minutos/4°C, seguido por filtração através de uma camada de tecido failet. A polpa filtrada foi misturada com 5 volumes de solução de NaCl (50 mM) por 5 minutos e seguida de uma filtração. Esse processo repetiu-se por mais duas vezes e, após essa etapa, o material obtido foi submetido ao processo de congelamento (-22°C) por 24h para posteriormente ser liofilizado (liofilizador de bancada da marca Liotop – modelo L101).

4.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML)

O rendimento da extração da PML foi calculado através da equação 1 e expresso em g de proteína/100g de subproduto (ARNESEN e GILDBERG, 2007; BENJAKUL et al., 2010; BINSI et al., 2009; BORAN e REGENSTEIN, 2009).

$$\text{Produção de PML (\%)} = \frac{\text{Peso da proteína liofilizada (g)}}{\text{Peso úmido do subproduto (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML)

4.4.1 Composição Centesimal da PML

As análises de umidade, cinzas, proteína bruta e lipídios foram realizadas nas proteínas miofibrilares liofilizadas, segundo os metodologia da Association of Official Analytical Chemists, AOAC (2000). Os valores obtidos pelas análises foram expressos em base seca.

4.4.2 Caracterização da microestrutura das PML (MEV)

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

4.4.3 Determinação da composição de aminoácidos da PML

O perfil de aminoácidos foi determinado utilizando cromatógrafo líquido de alta performace Waters-PICO Tag™, Waters Model 712 WISP (Waters,

Watford, Herts, UK), segundo o método proposto por White, Hart, and Kry (1986).

4.5 PREPARAÇÃO DOS FILMES

Os filmes foram preparados de acordo com a metodologia de Zavareze et al. (2012) com modificações. A proteína miofibrilar liofilizada foi triturada, de modo a facilitar na homogeneização, posteriormente foram passadas em peneiras de abertura cujo “mesh” utilizado será de 0,42mm. Os filmes com PML foram preparados por suspensão (p/v) (método de casting), sendo ajustado o pH (pHmetro de bancada modelo HI 221) da solução para 11 com NaOH 2M, utilizando glicerol como plastificante. A solução foi homogeneizada (modelo TE – 102 turratec da Tecnal) com uma velocidade de 10.000 rpm durante 5 minutos. Em seguida a solução foi tratada termicamente com ajuda de um banho-maria (modelo TE – 057 banho-maria da Tecnal) a uma determinada temperatura e tempo para permitir a formação da película.

As soluções filmogênicas (SF) foram filtradas em tecido tipo failet, de modo a reter proteínas que não se dissolveram, em seguida foram despejadas em recipiente de silicone com diâmetro 22 cm/2,5 cm de espessuras, posteriormente levadas para secagem em D.B.O. com circulação de ar sob determinada temperatura e tempo. A concentração de proteína e de plastificante, temperatura e tempo do banho, temperatura e tempo de secagem do filme, quantidade de SF foram ajustados conforme o ensaio correspondente ao planejamento fracionário Plackett Burman (Tabela 1). A espessura do filme foi controlada pelo volume de solução filmogênica colocado na forma. Após a secagem, os filmes foram embalados a vácuo e acondicionados a 25 °C.

4.6 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO PLACKETT BURMAN (PB)

Foram selecionadas variáveis e suas faixas de trabalho baseadas em dados obtidos da literatura (ZAVARESE et al., 2012; LIMPAN et al., 2012; ARFAT, et al., 2014; MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, 2000). Após essa definição, foi realizado um delineamento experimental fracionário do tipo Plackett Burman (PB), utilizado para seleção prévia das variáveis. O objetivo

dos experimentos foi selecionar entre sete variáveis independentes testadas, as mais importantes em relação às variáveis dependentes, permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração (RT) e alongação (E). Foram escolhidos PB-8 (oito ensaios), com 3 repetições no ponto central, que permite a determinação do erro puro e repetibilidade do processo, totalizando 11 ensaios. Os ensaios foram medidos três vezes para cada resposta.

4.6.1 variáveis independentes

Dentre as variáveis independentes que podem influenciar na obtenção do filme, temos: Concentração de proteínas (Cp); Concentração de plastificantes (Cpl); Temperatura do banho-maria (Tb); Tempo do banho-maria (Tbm); Temperatura de secagem do filme (Ts); Tempo de secagem do filme (Tsf) e Quantidade de solução filmogênica (Qsf) (Tabela 1).

O pH é considerado uma das mais importantes. No entanto, fixou-se esta variável no planejamento pelo fato do filme não se formar em intervalos de pH de 5 a 6,5. Filmes não podem ser formados a pH 5 e 6, porque é próximo do ponto isoelétrico das proteínas (HAMAGUCHI, et al., 2007).

Tabela 1- Valores reais das variáveis independentes do planejamento experimental fracionário Plackett-Burman e seus respectivos níveis codificados.

Variáveis		Unidade	Nível baixo (-)	Central (0)	Nível alto (+)
C _p	Concentração da proteína	%	1,0	1,5	2,0
C _{pl}	Concentração do plastificante	%	30	40	50
T _b	Temperatura do banho	°C	40	65	90
t _b	Tempo do banho	Min.	30	35	40
T _s	Temperatura de secagem	°C	25	30	35
t _s	Tempo de secagem	Horas	16	20	24
Q _{sf}	Quantidade SF	ml	120	130	140

4.6.2 Variáveis dependentes

4.6.2.1 Propriedade de barreira dos filmes

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi medido utilizando um método modificado ASTM (American Society for Testing and Materials, 1989), como descrito por Shiku, et al., (2004). O filme será selado em becker de permeação de vidro contendo sílica gel seco (0% UR; 0 Pa de pressão de vapor de água a 30 °C) com cola de silicone (Adesivo de silicone, alta temperatura – Siloc). Os beckers serão colocados em dessecador contendo água destilada a 30 °C (99% de UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor a 30 °C) e os beckers serão pesados em intervalos de 1 h ao longo de um período de 10 h. PVA do filme foi calculada de acordo com a equação 2:

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \frac{X}{A \Delta P} \quad \text{Equação 2}$$

Em que: w representa o ganho de peso do becker (g); l é a espessura da película (m); A é a área exposta da película (m²); t é o tempo de ganho (s); (P₂-P₁) é a diferença de pressão de vapor através da película (4244,9 Pa, a 30 °C).

4.6.2.2 Propriedades mecânicas dos filmes (resistência à tração e alongação)

Para verificar a resistência à tração e alongação na ruptura dos filmes utilizou um texturômetro, empregando-se metodologia ASTM D882-91 (ASTM, 1996). As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (25 °C). As amostras serão cortadas em tiras de 100 mm de comprimento e 25 mm de largura. A distância máximo que o texturômetro foi programado foi de 100mm. A resistência à tração (RT) e a porcentagem de alongação (E) foram calculadas pelas Equações 3 e 4, respectivamente.

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad \text{Equação 3}$$

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

$$E(\%) = \frac{d_{final}}{d_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

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

4.7 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

As variáveis independentes a serem estudadas no DCCR, foram concentração de proteína (C_p), concentração de plastificante (C_{pl}) e temperatura de secagem do filme (T_s). As variáveis que não mostraram efeito significativo sobre a resposta no PB foram fixadas em função do menor tempo e custo para o processo. Dentre elas foram: o tempo e temperatura do banho; o tempo de secagem do filme e a quantidade de solução filmogênica.

O DCCR foi utilizado para definição da melhor condição de propriedades de barreiras dos filmes, aliado às condições de melhor resistência à tração e alongação na ruptura dos mesmos. A definição dos níveis das variáveis estudadas está descrita na Tabela 2. Os ensaios foram medidos três vezes para cada resposta.

Foram realizados 18 ensaios, sendo 8 ensaios fatoriais (combinação entre os níveis ± 1), 4 ensaios no ponto central (quatro variáveis no nível 0) e 6 ensaios nos níveis axiais (α e $-\alpha$, definidos em -1,68 e +1,68). Para cada resposta foi verificada a significância das variáveis ou interações na equação polinomial descrita na Equação 5. Os modelos foram desenvolvidos ignorando os efeitos que não apresentaram significância e a equação resultante foi encontrada quando os níveis de significância (p) para concentração de proteína (C_p), concentração de plastificante (C_{pl}) e temperatura de secagem (T_s) observados foram iguais ou menores que 5% ($p \leq 0,05$).

$$y = f(X1) = \beta_0 + \beta_1(C_p) + \beta_{11}(C_p)^2 + \beta_2(C_{pl}) + \beta_{22}(C_{pl})^2 + \beta_3(T_s) + \beta_{33}(T_s)^2 + \beta_{12}(C_p C_{pl}) + \beta_{13}(C_p T_s) + \beta_{23}(C_{pl} T_s)$$

Equação 5

Onde β_n são os parâmetros (efeitos) do modelo, y a variável dependente e as variáveis independentes já estão codificadas. Este modelo foi ajustado aos

pontos experimentais e o nível de significância do modelo foi analisado por meio dos coeficientes de correlação (R^2) e do teste F.

Tabela 2 - Definição dos níveis das três variáveis estudadas no processo de obtenção do filme a partir de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) no DCCR 2³.

Variáveis Independentes	Unidade	Símbolo	-1,68	-1	0	1	+1,68
Concentração de proteína	%	C_p	0,66	1	1,5	2	2,34
Concentração de plastificante	%	C_{pl}	23,18	30	40	50	56,82
Temperatura de secagem	°C	T_s	21,59	25	30	35	38,41

4.8 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO: FUNÇÃO DESEJABILIDADE

Na otimização do processo de produção dos filmes foram consideradas as seguintes propriedades: permeabilidade ao vapor de água, resistência mecânica e alongação. A baixa PVA, a alta resistência mecânica e alongação foram as características consideradas desejáveis para a obtenção de um bom filme. Desta forma, o objetivo foi encontrar os valores (Tabela 3) operacionais ótimos das variáveis independentes (C_p , C_{pl} e T_s) que satisfizessem simultaneamente os requisitos necessários às variáveis respostas (função desejabilidade).

Tabela 3 - Condições de desejabilidade (d_i) das variáveis respostas durante a otimização da produção dos filmes.

Variável resposta		Mínimo	Médio	Máximo	s	t
PVA	Valor	$2,18E^{-11}$	$1,03E^{-10}$	$1,84E^{-10}$		
	d_i^a	1,00	0,50	0,00	5,00	5,00
RT	Valor	2,64	5,16	7,67		
	d_i	0,000	1,00	1,00	5,00	5,00
E	Valor	51,62	101,00	150,38		
	d_i	0,00	1,00	1,00	5,00	5,00

^a = Condições de desejabilidade; Expoentes s e t; PVA = permeabilidade ao vapor de água; RT = resistência à tração e E = alongação.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO FILME OTIMIZADO

Nas condições ótimas foi reproduzido o filme correspondente e determinadas a espessura, solubilidade, cor, transparência e caracterização da microestrutura dos filmes (MEV) para melhor compreensão das propriedades físicas do biofilme.

4.9.1 Espessura e solubilidade dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada por meio da média de oito medidas aleatórias em torno do filme, obedecendo a um afastamento da borda de 10 mm, utilizando-se um micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, IP54, São Paulo, Brasil) (ZAVAREZE et al., 2012).

Para determinação da solubilidade, os filmes foram recortados em discos de 2 cm de diâmetro e foi determinada 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 destilada. O sistema será agitado em Incubadora Shaker refrigerada (Cientec, CT-712RNT, São Paulo, Brasil) 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 que não se dissolveu em água (GONTARD et al., 1994).

4.9.2 Cor dos filmes

A cor dos filmes foi determinada com um colorímetro controlado pelo programa Universal Software 3.2, trabalhando com D_{65} (luz do dia) e usando-se os padrões CIE Lab: L^* , variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* , do verde (-) ao vermelho (+); e b^* , do azul (-) ao amarelo (+) (GENNADIOS et al., 1996). Os filmes foram aplicados na superfície de uma placa branca padrão e os padrões L^* , a^* e b^* serão medidos. A diferença de cor (ΔE^*) foi calculada de acordo com a seguinte equação 6:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0,5} \quad \text{Equação 6}$$

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

4.9.3 A transmissão da luz e valor de transparência

A transmitância de luz de filmes foi medida na gama do visível e ultravioleta (200-800nm) usando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Quioto, Japão), de acordo com o método do Shiku et al. (2004). O valor de transparência do filme foi calculado em triplicata e usou-se a seguinte equação 7 (HAN e FLOROS, 1997):

$$\text{Valor de transparência} = \frac{-\log T_{600}}{x} \quad \text{Equação 7}$$

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

4.9.4 Caracterização da microestrutura dos filmes (MEV)

As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – LABMEV do Instituto de Geociências da UFPA no equipamento MEV modelo LEO-1430. As amostras foram metalizadas com ouro e o tempo de recobrimento será de 1,5 minutos. As condições de análises para as

imagens de elétrons secundários: foram corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kv, distância de trabalho = 15 mm.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do software STATISTICA 7 for Windows através da hierarquização dos efeitos, análise de variância e análise de superfície de resposta do modelo proposto ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DA PROTEÍNA MIOFIBRILAR LIOFILIZADA (PML)

O valor de rendimento do processo de obtenção da proteína miofibrilar liofilizada foi de 16,8%. A etapa de lavagem do resíduo do processo de obtenção das proteínas miofibrilares retirou gordura, sangue, mineral e proteínas sarcoplasmáticas, permanecendo uma concentração considerável das proteínas miofibrilares, pois segundo Hemung e Chin (2013) proteínas sarcoplasmáticas são solúveis em água ou em solução de baixa força iônica. Segundo Hamaguchi, et al. (2007) o processo de lavagem pode remover as proteínas de baixo peso molecular tal como as proteínas sarcoplasmáticas, levando ao aumento da concentração de proteínas miofibrilares que desempenham um papel essencial na formação de uma forte rede de película.

De acordo com Zavareze et al. (2012) as proteínas miofibrilares são normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH da solução. A maior importância da lavagem consiste na remoção das proteínas solúveis em água, resultando no aumento da concentração de proteína miofibrilar (actomiosina), o que melhora a força de gel e a elasticidade (BELIBAGLI et al., 2003).

Vidal et al. (2011) obtiveram rendimento de resíduo de 18,34% ao trabalhar com concentrado proteico de tilápia submetidos a vários ciclos de lavagens de água e H_3PO_4 (0,05%) para alcançar o ponto isoelétrico da proteína miofibrilar ($pH \pm 5$). Pessatti (2001), ao elaborar um concentrado proteico de peixe, através de lavagens sucessivas com etanol, obteve um

rendimento inferior de 14%. Desta forma, pode-se considerar o rendimento da PML satisfatório, tendo se situado entre os valores médios observados na literatura.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS (PML)

5.2.1 Composição Centesimal da PML

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados referentes à composição centesimal das proteínas miofibrilares liofilizadas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).

Tabela 4 – Composição centesimal da PML.

Análises	Resultados
Proteínas (%)	90,38±0,18
Lipídeos (%)	1,37±0,06
Umidade (%)	4,72±0,10
Cinzas (%)	2,57±0,03

O elevado teor de proteínas observado nesse trabalho reflete a eficiência da metodologia empregada (Item 4.2) para obtenção das PML, no qual pôde reter frações de proteínas miofibrilares que seriam eventualmente lixiviadas pelas sucessivas lavagens com soluções salinas. Pois de acordo com Cuq et al (1995) podem ser dispersas, não apenas em solução salina, mas também soluções de baixa força iônica neutra. Desta forma, como se utilizou uma baixa concentração de cloreto de sódio, em torno de 0,05M, pôde-se obter uma quantidade bastante significativa de proteína miofibrilar. Teve-se o cuidado, também, da retirada totalmente da pele presente no subproduto, descartando a presença das proteínas estromáticas. As proteínas do estroma (tecido conectivo) são o colágeno e a elastina (ZAVAREZE et al., 2012). Sendo consideradas proteínas fibrosas e insolúveis (SILVA, 2006).

O baixo teor de gordura está relacionado, provavelmente, à espécie estudada. Estudos reportados por Figueiredo et al. (2010) verificaram que as

carnes das espécies pescada amarela e cará-açu apresentaram os menores teores de lipídeos e das espécies uritinga e pescada amarela os menores teores de colesterol, portanto são mais recomendáveis para pessoas com problemas de controle de colesterol. Com relação à umidade, observou-se uma redução significativa no seu valor, onde para a obtenção das PML foi realizada a etapa de liofilização após obter o extrato proteico miofibrilar.

Os valores reportados por Monterrey-Quintro & Sobral (2000) referem-se ao preparo e caracterização de proteínas miofibrilares liofilizadas de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes, encontrando valores para proteínas, lipídeos e cinzas de 93,22%, 2,4% e 1,69, respectivamente. García e Sobral (2005) encontraram uma quantidade de proteína igual a 80% para proteínas miofibrilares liofilizadas de tilápia-do-nilo.

5.2.2 Caracterização da microestrutura das PML (MEV)

Os resultados do MEV para as proteínas miofibrilares liofilizadas de pescada amarela evidenciaram um conjunto desordenado de partículas de tamanhos heterogêneos (Figura 4A). Foi observada uma estrutura com fissuras, não lisa, com partículas quebradiças, provavelmente, devido à etapa de trituração, pois a agitação e trituração rompem o equilíbrio de forças que mantém a estrutura proteica. Segundo Haque et al. (2015) a desnaturação de proteínas durante o processamento, geralmente, reduz a sua eficácia funcional e nutricional. No entanto, um certo grau de processamento é essencial para alargar o prazo de validade e para utilizar estas proteínas como ingredientes. A Figura 4B mostra com mais detalhes o formato não circular destas partículas, com superfície heterogênea, rachaduras nas mesmas e apresentando lacunas em sua superfície, provavelmente, devido à etapa de liofilização e/ou a utilização do vácuo para embalar a mesma.

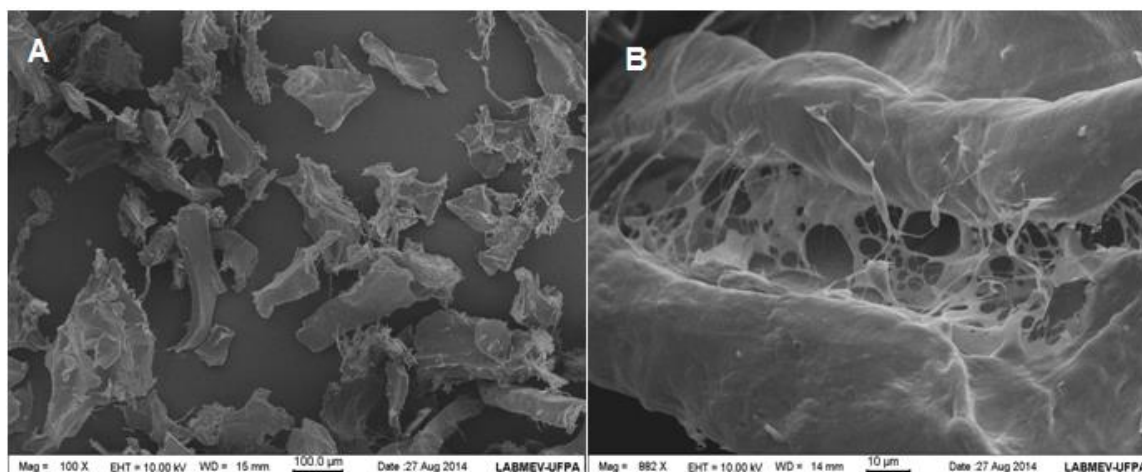


Figura 4 - Microfotografia da proteína miofibrilar liofilizada de pescada amarela. Ampliação de 100X(A) e 882X(B).

5.2.3 Perfil de aminoácidos da PML

Os resultados para a determinação do perfil de aminoácidos totais presentes na proteína miofibrilar liofilizada da pescada amarela estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil de aminoácidos totais presentes na proteína miofibrilar liofilizada (PML) da pescada amarela (g/100g de proteína).

Aminoácido		PML
Aspartato	ASP	9,53
Glutamato ou ácido glutâmico	GLU	15,29
Hidroxiprolina	HPRO	0,47
Serina	SER	3,55
Glicina	GLY	3,78
Histidina**	HYS	1,53
Taurina	TAU	0,07
Arginina**	ARG	6,57
Treonina**	TRE	4,51
Alanina	ALA	5,39
Prolina	PRO	3,37
Tirosina	TYR	3,43
Valina**	VAL	4,67
Metionina**	MET	2,94
Cisteína*	CYS	0,49
Isoleucina**	ILE	4,49
Leucina**	LEU	7,63
Felilalanina**	PHE	3,61
Lisina**	LIS	9,02
TOTAL		90,36

* ½ Cistina equivale a 1 cisteína; ** Aminoácidos essenciais

A composição de aminoácidos dos alimentos tem um papel importante em várias atividades fisiológicas do corpo humano e afeta, direta ou indiretamente na manutenção da boa saúde. Os aminoácidos são essenciais para a síntese de uma grande variedade de proteínas com funções importantes, incluindo transportadores de oxigênio, vitaminas, CO₂, enzimas e proteínas estruturais (CHALAMIAH, et al., 2012).

Os aminoácidos polares iônicos estão em alta concentração, como o ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, arginina, e leucina (Tabela 4). Com exceção da leucina que não é considerada um aminoácido iônico, no entanto encontra-se em alta concentração. Os aminoácidos predominantes entre os aminoácidos não essenciais foram o ácido aspártico e ácido glutâmico, e aqueles entre os aminoácidos essenciais lisina e leucina, valores próximos também reportados por Usydus et al., 2009. Segundo Rosa e Nunes (2003), os principais aminoácidos essenciais encontrados em organismos aquáticos são a arginina, leucina e lisina. Neste estudo, também foram observados, além destes, todos os aminoácidos essenciais. Não foi realizada a quantificação do aminoácido triptofano devido à metodologia empregada.

De acordo com Zuraini et al. (2006) os aminoácidos aspartato, glutamato, lisina e leucina são conhecidos por desempenharem um papel-chave no processo de cicatrização de feridas. Os principais aminoácidos são ácido glutâmico, ácido aspártico e lisina por serem considerados componentes importantes em processos de cura, pois qualquer deficiência nesses componentes essenciais vai dificultar o processo de recuperação.

Em indivíduos adultos, aminoácidos de cadeias ramificadas (ACR) são relevantes para a manutenção da proteína corporal além de ser fonte de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina. O papel fundamental dos ACR – especialmente a leucina – é na regulação de processos anabólicos, apresentam potenciais efeitos terapêuticos; favorece o processo de cicatrização; melhorar o balanço protéico muscular em indivíduos idosos; e propiciar efeitos benéficos no tratamento de patologias hepáticas e renais (SHIMOMURA et al., 2006a; TOM e NAIR, 2006).

A arginina, considerada precursora da prolina, logo, entende-se que a presença dela é um desmembramento da prolina e hidroxiprolina. Pois a prolina + hidroxiprolina são considerados iminoácidos, já que sua estrutura

resulta da ligação terminal alfa-amina (NH_2) à cadeia variável alifática (ALFARO et al., 2013). A arginina pode ser utilizada como fonte de óxido nítrico para o organismo e é necessária para a síntese da creatina no organismo, importante fonte de energia para a contração muscular (UDENIGWE et al., 2012).

As PML apresentaram boa fluidez, ou seja, sem nenhuma característica de aglomeração, podendo ser manipuladas de forma fácil, apresentando uma coloração branca. Os filmes elaborados com as proteínas de pescada amarela mostraram-se flexíveis e facilmente manipuláveis, com bom aspecto visual (Figura 5).

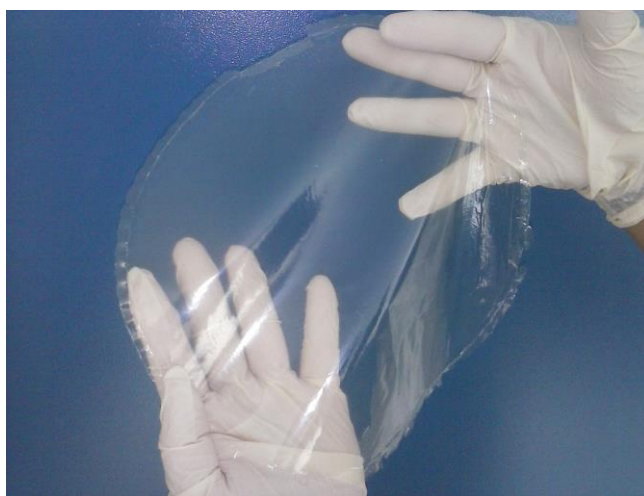


Figura 5 – Filme biodegradável obtido de proteína miofibrilar de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*).

5.3 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO PLACKETT BURMAN (PB)

Os resultados do delineamento PB da obtenção dos filmes juntamente com a matriz codificada e seus respectivos níveis estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Delineamento Plackett Burman das variáveis independentes (com níveis codificados) e as respectivas respostas como PVA, RT e E.

Ensaio	C _p	C _{pl}	T _b	t _b	Q _{sf}	T _s	t _s	PVA (gm ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	RT (MPa)	E (%)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	5,67E ⁻¹¹ ± 6,62E ⁻¹³	3,94 ± 0,12	159,40 ± 6,33
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1,09E ⁻¹⁰ ± 1,64E ⁻¹¹	8,53 ± 0,14	190,52 ± 8,21
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	8,53E ⁻¹¹ ± 4,54E ⁻¹²	2,10 ± 0,07	26,80 ± 2,98
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1,49E ⁻¹⁰ ± 5,37E ⁻¹²	2,47 ± 0,14	32,24 ± 4,08
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	5,40E ⁻¹¹ ± 1,76E ⁻¹²	7,11 ± 0,57	11,00 ± 0,81
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1,40E ⁻¹⁰ ± 1,49E ⁻¹¹	16,60 ± 0,07	42,20 ± 3,83
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	8,03E ⁻¹¹ ± 1,90E ⁻¹²	1,48 ± 0,17	175,60 ± 17,24
8	1	1	1	1	1	1	1	1,70E ⁻¹⁰ ± 6,25E ⁻¹²	2,05 ± 0,06	199,60 ± 0,16
9	0	0	0	0	0	0	0	1,09E ⁻¹⁰ ± 6,04E ⁻¹²	4,37 ± 0,26	155,31 ± 3,81
10	0	0	0	0	0	0	0	9,98E ⁻¹¹ ± 2,02E ⁻¹²	4,34 ± 0,40	151,00 ± 6,84
11	0	0	0	0	0	0	0	9,83E ⁻¹¹ ± 8,21E ⁻¹²	6,61 ± 0,07	149,48 ± 1,32

PVA: permeabilidade ao vapor de água; RT: resistência à tração; E: elongação.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 estão apresentados os efeitos estimados, os coeficientes t e as significâncias estatísticas (p) para cada fator no delineamento PB para permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e elongação, obtida após o processo de obtenção do filme. Esses valores foram determinados através do Erro puro. Os fatores em negrito indicam que a variável apresentou efeito significativo sobre a PVA, RT e E ($p \leq 0,05$).

Tabela 7 - Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e a significância estatística, no delineamento PB para Permeabilidade ao Vapor de Água.

Variáveis		Efeitos	p-valor Erro Puro	t
C_p	Conc. de proteína	7,29E⁻¹¹	0,002995	18,23245
C_{pl}	Conc. de plastificante	3,11E⁻¹¹	0,016112	7,78265
T _b	Temperatura do banho	1,09E ⁻¹¹	0,112470	2,72417
t _b	Tempo do banho	3,67E ⁻¹²	0,455416	0,91827
Q _{sf}	Quant. solução filmogênica	1,47E ⁻¹¹	0,066444	3,68341
T _s	Temperatura de secagem	-2,96E ⁻¹²	0,536416	-0,73992
t _s	Tempo de secagem	-1,75E ⁻¹²	0,704309	-0,43774

Tabela 8 - Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e a significância estatística, no delineamento PB para Resistência à Tração.

Variáveis		Efeitos	<u>p-valor</u> Erro Puro	t
C _p	Conc. de proteína	3,75555	0,055138	4,08049
C_{pl}	Conc. de plastificante	-7,02011	0,016758	-7,62751
T _b	Temperatura do banho	2,55110	0,109240	2,77183
t _b	Tempo do banho	-3,28303	0,070393	-3,56709
Q _{sf}	Quant. solução filmogênica	1,27707	0,299649	1,38757
T _s	Temperatura de secagem	-3,06870	0,079388	-3,33421
t _s	Tempo de secagem	-1,17250	0,330699	-1,27395

Tabela 9 - Efeitos estimados das variáveis, coeficiente t e a significância estatística, no delineamento PB para Elongação.

Variáveis		Efeitos	<u>p-valor</u> Erro Puro	t
C_p	Conc. de proteína	22,9400	0,008578	10,7274
C _{pl}	Conc. de plastificante	7,7800	0,067941	3,6382
T _b	Temperatura do banho	4,8600	0,150961	2,2727
t _b	Tempo do banho	-8,2200	0,061501	-3,8439
Q _{sf}	Quant. solução filmogênica	4,6600	0,161163	2,1792
T_s	Temperatura de secagem	153,2200	0,000195	71,6502
t _s	Tempo de secagem	4,6200	0,163317	2,1604

Definiram-se como variáveis independentes significativas apenas àquelas que apresentaram significância ($p \leq 0,05$) pelo Erro Puro, pois o mesmo avalia as repetições nos experimentos, ou seja, os erros aleatórios das replicatas. As Tabelas 7, 8 e 9 mostram que as variáveis independentes significativas para o Erro Puro foram: concentração de proteínas, concentração de plastificante e temperatura de secagem.

De acordo com a Tabela 7 a variável concentração de proteína (C_p) e Concentração de plastificante (C_{pl}) apresentaram contrastes positivo em relação à resposta permeabilidade ao vapor de água (PVA). As maiores PVA verificou-se nos ensaios 2, 4, 6 e 8 com 2% de proteína. Filmes de proteína são freqüentemente associados com alta PVA, provavelmente causada pelo grande número de grupos hidrofílicos (HAMAGUCHI et al., 2007). Filmes obtidos de proteínas miofibrilares possuem alta absorvidade de água e permeabilidade ao vapor de água, devido à hidrofiliidade de aminoácidos em moléculas de proteínas e às quantidades significativas de plastificantes hidrofílicos, tais como

glicerol e sorbitol, incorporados nas películas para conferir flexibilidade adequada do filme (PRODPRAN, BENJAKUL, e ARTHAN, 2007).

Valores de PVA foram reportados nos filmes elaborados com 1 g de proteína miofibrilar liofilizada (PML), 50 a 75 g de glicerol, apresentando uma alta higroscopicidade (SOUZA et al., 2012). A PVA reportado por Blanco-Pascual et al. (2014) que trabalharam com proteína miofibrilar elaborando o filme com 25g de proteína e 400g de glicerol e sorbitol foi considerada com higroscopicidade alta.

A concentração de plastificante (C_{pl}) (Tabela 8) apresenta um contraste negativo em relação à resposta RT. Os ensaios 3, 4, 7 e 8 foram os que apresentaram os menores valores para RT, por apresentarem maiores concentrações de plastificantes (50%). A utilização de plastificante é necessária para reduzir a fragilidade e/ou para melhorar a capacidade de trabalho do filme ao reduzir as interações intermoleculares entre cadeias adjacentes do biopolímero, o que resulta em um aumento da mobilidade destas cadeias e conseqüentemente, em películas flexíveis. Como conseqüência, a um nível macroscópico, os filmes apresentam uma redução na resistência mecânica e um aumento na permeabilidade ao vapor de água e na elasticidade (SOBRAL et al., 2005).

Filmes elaborados com proteínas miofibrilares (3-5%) e glicerol (30%) apresentaram RT maior para os filmes com maiores concentrações de proteínas (ZAVAREZE et al., 2012). Filmes elaborados com proteínas miofibrilares na proporção 25g de proteína e 400g de glicerol e sorbitol apresentaram uma baixa RT (BLANCO-PASCUAL et al., 2014).

De acordo com a Tabela 9 as variáveis C_p (concentração de proteína) e T_s (temperatura de secagem) apresentaram contrastes positivo em relação à resposta alongação (E). Os ensaios 1, 2, 7, 8, 9, 10 e 11 foram os que apresentaram valores maiores para alongação, por apresentarem maiores valores de concentração de proteínas e temperatura de secagem do filme. De acordo com Denavi et al (2009), no caso de filmes de proteína, as condições de secagem deve interferir nas propriedades finais do material. Isso ocorre porque as estruturas de proteínas podem ser modificadas em função dos parâmetros de processamento, como conseqüência da desnaturação de proteínas.

A presença de pequenos peptídeos provoca uma redução na interação de macromoléculas, que conduz ao aumento da elongação do filme (BENJAKUL et al., 2008). Com o processo de lavagem para a obtenção das PML (Ítem 4.2), parte de pequenos peptídeos foram lixiviados, proteínas sarcoplasmáticas, obtendo macromoléculas como as proteínas miofibrilares. No entanto, as proteínas miofibrilares restantes podem ter alguma clivagem das cadeias, provavelmente, devido ao processo de desnaturação durante a obtenção do filme (BENJAKUL et al., 2008).

Pode-se concluir, portanto, que é desejável o uso de temperatura em torno de 35 °C para não haver perda das propriedades mecânicas do filme. Provavelmente, de acordo com este estudo, mantendo-se a temperatura numa variação de 30 a 35 °C durante a secagem, não afeta fortemente a estruturação e formação das zonas de junção de forma que as propriedades mecânicas dos mesmos não foram influenciadas.

Observou-se uma baixa elongação reportada por Blanco-Pascual et al (2014) ao obterem filmes a base de proteínas miofibrilar com 25g de proteína, 400g de plastificante glicerol e sorbitol. Zavarese et al. (2012) obtiveram elongação alta ao trabalharem com 3, 4 e 5% de proteínas miofibrilares de pescado e 30%.

5.4 PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (PCCR)

5.4.1 Condições para a otimização do filme

As variáveis independentes estudadas no DCCR, como concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cpl) e temperatura de secagem do filme (Ts) foram definidas preliminarmente através do delineamento Plackett Burman, como aquelas que exerceram efeito significativo sobre a permeabilidade ao vapor de água dos filmes, resistência à tração e elongação.

Dentre as variáveis que não apresentaram significância, o tempo e temperatura do banho foram fixados em 50°C por 30 minutos para permitir a formação da película. O tempo de secagem do filme foi fixado por 16h e a quantidade de solução filmogênica foi de 120ml, para padronizar a espessura do filme. Os resultados do PCCR 2³ estão exibidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Matriz codificada do planejamento experimental 2³ para a otimização da obtenção do filme da pescada amarela.

Ensaio	Níveis das variáveis			Respostas		
	C _p	C _{pl}	T _s	PVA (gm ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	RT (MP _a)	E (%)
1	-1	-1	-1	6,75E ⁻¹¹ ±2,16E ⁻¹¹	7,67 ±0,17	51,62 ±8,36
2	-1	-1	1	8,38E ⁻¹¹ ±4,85E ⁻¹¹	5,88 ±0,14	69,02 ±16,64
3	-1	1	-1	5,36E ⁻¹¹ ±3,10E ⁻¹¹	3,98 ±0,26	98,20 ±25,26
4	-1	1	1	5,76E ⁻¹¹ ±3,33E ⁻¹¹	2,94 ±0,10	125,32 ±27,67
5	1	-1	-1	1,10E ⁻¹⁰ ±6,34E ⁻¹¹	7,41 ±0,76	88,10 ±22,47
6	1	-1	1	1,23E ⁻¹⁰ ±7,12E ⁻¹¹	6,10 ±0,36	100,18 ±23,35
7	1	1	-1	1,58E ⁻¹⁰ ±9,10E ⁻¹¹	3,24 ±0,66	101,78 ±33,16
8	1	1	1	1,84E ⁻¹⁰ ±1,06E ⁻¹⁰	2,93 ±0,37	123,22 ±20,20
9	-1,68	0	0	2,18E ⁻¹¹ ±2,42E ⁻¹¹	2,86 ±0,13	88,92 ±29,29
10	1,68	0	0	1,23E ⁻¹⁰ ±7,13E ⁻¹¹	3,53 ±0,23	112,74 ±27,31
11	0	-1,68	0	1,00E ⁻¹⁰ ±6,01E ⁻¹⁰	6,65 ±0,34	78,94 ±24,88
12	0	1,68	0	1,06E ⁻¹⁰ ±6,13E ⁻¹¹	2,64 ±0,33	114,98 ±14,09
13	0	0	-1,68	7,80E ⁻¹¹ ±5,49E ⁻¹¹	5,56 ±0,63	79,54 ±32,77
14	0	0	1,68	9,52E ⁻¹¹ ±1,77E ⁻¹²	4,35 ±0,25	103,36 ±13,13
15	0	0	0	8,05E ⁻¹¹ ±4,78E ⁻¹¹	3,32 ±0,40	150,384 ±8,04
16	0	0	0	8,45E ⁻¹¹ ±4,65E ⁻¹¹	3,55 ±0,22	145,48 ±5,83
17	0	0	0	8,69E ⁻¹¹ ±4,79E ⁻¹¹	3,60 ±0,26	146,66 ±3,79
18	0	0	0	9,42E ⁻¹¹ ±4,65E ⁻¹¹	3,97 ±0,12	145,54 ±7,32

C_p = concentração de proteínas; C_{pl} = concentração de plastificantes; T_s = temperatura de secagem do filme; PVA = permeabilidade ao vapor de água; RT = resistência à tração e E = alongação.

5.4.2 Estimativa dos efeitos dos modelos

As estimativas dos efeitos das variáveis para cada modelo matemático de cada resposta avaliada estão apresentados na Tabela 11. Os efeitos destacados em **negrito** indicam que a variável apresentou efeito significativo ($p \leq 0,05$).

Tabela 11 - Estimativa dos efeitos das variáveis de polinômios de segunda ordem (eq. 5) associada à significância para cada resposta estudada.

Variáveis independentes	PVA		RT		E	
	Estimado	p-valor	Estimado	p-valor	Estimado	p-valor
Constante	8,57E⁻¹¹	0,000082	3,57679	0,000115	146,9513	0,000001
C_p (%) (L)	7,07E⁻¹¹	0,000186	0,05009	0,752930	15,9891	0,001031
C_p (%) (Q)	-2,42E ⁻¹²	0,507424	0,01653	0,919705	-32,0798	0,000146
C_{pl} (%) (L)	1,55E⁻¹¹	0,033863	-3,03323	0,000240	29,3203	0,000170
C_{pl} (%) (Q)	1,91E⁻¹¹	0,009630	1,04079	0,006246	-34,8163	0,000114
T_s (°C) (L)	1,30E⁻¹¹	0,024667	-0,95107	0,007240	17,2954	0,000817
T_s (%) (Q)	7,43E ⁻¹²	0,104790	1,25784	0,003620	-38,7125	0,000083
1 x 2 (L)	3,72E⁻¹¹	0,002742	-0,17498	0,424481	-16,5400	0,002052
1 x 3 (L)	4,82E ⁻¹²	0,320468	0,30722	0,203881	-2,7500	0,190848
2 x 3 (L)	2,71E ⁻¹³	0,950869	0,43560	0,105423	4,7700	0,061482

A Tabela 12 mostra os resultados da análise de variância, os coeficientes de regressão e os valores de F calculado e tabelado para as variáveis dependentes, permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongação.

Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) para a PVA, RT e E dos filmes.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal.}	F _{tab.}	R ²
Permeabilidade ao vapor de água						
Regressão	2,23E ⁻²⁰	5	4,46E ⁻²¹	34,62	9,01	0,94
Resíduo	1,55E ⁻²¹	12	1,23E ⁻²²			
F. A.	2,40E ⁻²²	9	7,17E ⁻²³	2,18	8,81	
Erro	9,88E ⁻²³	3	3,29E ⁻²³			
Total	2,38E ⁻²⁰	17	1,40E ⁻²¹			
Resistência à tração						
Regressão	42,64	4	10,66	42,07	9,12	0,93
Resíduo	3,29	13	0,25			
F. A.	0,64	10	0,06	0,89	8,79	
Erro	0,22	3	0,07			
Total	45,93	17	2,70			
Elongação						
Regressão	13811,86	7	1973,12	96,83	8,89	0,99
Resíduo	203,77	10	20,38			
F. A.	60,63	7	8,66	1,62	8,89	
Erro	16,01	3	5,34			
Total	14015,63	17	824,45			

Observando a Tabela 11, para a resposta permeabilidade ao vapor de água (PVA), verifica-se que os efeitos significativos foram: concentração de proteína (C_p) linear, concentração de plastificante (C_{pl}) linear e quadrática, temperatura de secagem (T_s) linear e a interação C_p e C_{pl} . Onde estes efeitos apresentaram significância positiva para a PVA.

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, a relação de $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ deve ser superior a três (BOX et al. 1978), e o F da falta de ajuste em relação ao erro puro deve apresentar o menor valor possível, pois um alto F indica que há uma grande falta de ajuste dos dados ao modelo obtido (BOX; WETZ, 1973).

Desta forma, a análise de variância (ANOVA) (Tabela 12) mostrou que o modelo apresentou regressão significativa ($F_{\text{cal.}} > F_{\text{tab.}}$) e preditiva, pois o F da regressão foi, aproximadamente, 4 vezes maior que o F tabelado e o F calculado da falta de ajuste não foi significativo, visto que foi menor que o F

tabelado. Através da ANOVA, o valor de R^2 , para a permeabilidade, indicou que o modelo (Tabela 13) descreveu adequadamente o comportamento do processo, explicando mais de 94% da variação dos dados experimentais. Segundo Barros Neto, Scarminio, Bruns (2001), quanto mais próximo de 1 o valor de R^2 menor o erro e melhor o ajuste do modelo. Segundo estes autores, modelos com $R^2 < 0,60$ devem ser usados somente como indicadores de tendência, nunca para fins preditivos.

Com relação à resistência à tração (Tabela 11) verifica-se que os efeitos significativos foram: concentração de plastificante (C_{pl}) linear e quadrático, temperatura de secagem (T_s) linear e quadrática. Como os efeitos C_{pl} e T_s lineares apresentaram significância negativa em relação a esta resposta, um aumento dessas variáveis provocará uma redução na resistência à tração.

Analisando os dados da Tabela 12, observa-se que o modelo obtido para a resistência apresentou regressão significativa ($F_{cal.} > F_{tab.}$) e preditiva, pois o F da regressão foi 4 vezes maior comparado ao F tabelado e o F calculado da falta de ajuste não foi significativo, visto que foi menor que o F tabelado. Através da ANOVA, o valor de R^2 , para a resistência à tração, indica que o modelo (Tabela 13) descreveu adequadamente o comportamento do processo, explicando mais de 93% da variação dos dados experimentais.

Para o parâmetro alongação (Tabela 11), os efeitos que apresentaram significância foram: concentração de proteína (C_p) linear e quadrática, concentração de plastificante (C_{pl}) linear e quadrática, temperatura de secagem (T_s) linear e quadrática e a interação C_p e C_{pl} . A maioria dos efeitos apresentou efeito negativo sobre a resposta, com exceção, da concentração de proteína, plastificante e temperatura de secagem linear.

Analisando os dados da ANOVA na Tabela 12, observa-se que o modelo obtido para a alongação apresentou regressão significativa ($F_{cal.} > F_{tab.}$) e preditiva, pois o F da regressão foi 11 vezes maior que o F tabelado e o F calculado da falta de ajuste não foi significativo, visto que foi menor que o F tabelado. Através da análise de variância, o valor de R^2 estava próximo a unidade, determinado em 0,99, indicando que o modelo (Tabela 13) definiu o comportamento do processo de forma adequada, explicando mais de 99% da variação dos dados experimentais.

Os modelos gerados a partir das variáveis que apresentaram efeitos significativos para as respostas PVA, RT e E nos testes F estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Modelo reduzido para PVA, RT e E em função das variáveis independentes, teste F e R^2 .

Respostas	Modelo	R^2
PVA	$8,57E^{-11} + 3,54E^{-11} (C_p) + 5,77E^{-12} (C_{pl}) + 9,55E^{-12} (C_{pl})^2 + 6,52E^{-12} (T_s) + 1,86E^{-11} (C_p C_{pl})$	0,94
RT	$3,58 - 1,52 (C_{pl}) + 0,52 (C_{pl})^2 - 0,48 (T_s) + 0,63 (T_s)^2$	0,93
E	$146,95 + 7,99 (C_p) - 16,04 (C_p)^2 + 14,66 (C_{pl}) - 17,41 (C_{pl})^2 + 8,65 (T_s) - 19,36 (T_s)^2 - 8,27 (C_p C_{pl})$	0,99

5.4.3 Gráficos de superfície de resposta

Observa-se nas Figuras 6, 7, 8 e 9 os gráficos em três dimensões e em duas dimensões da superfície de resposta e curva de nível para PVA, RT e E, respectivamente.

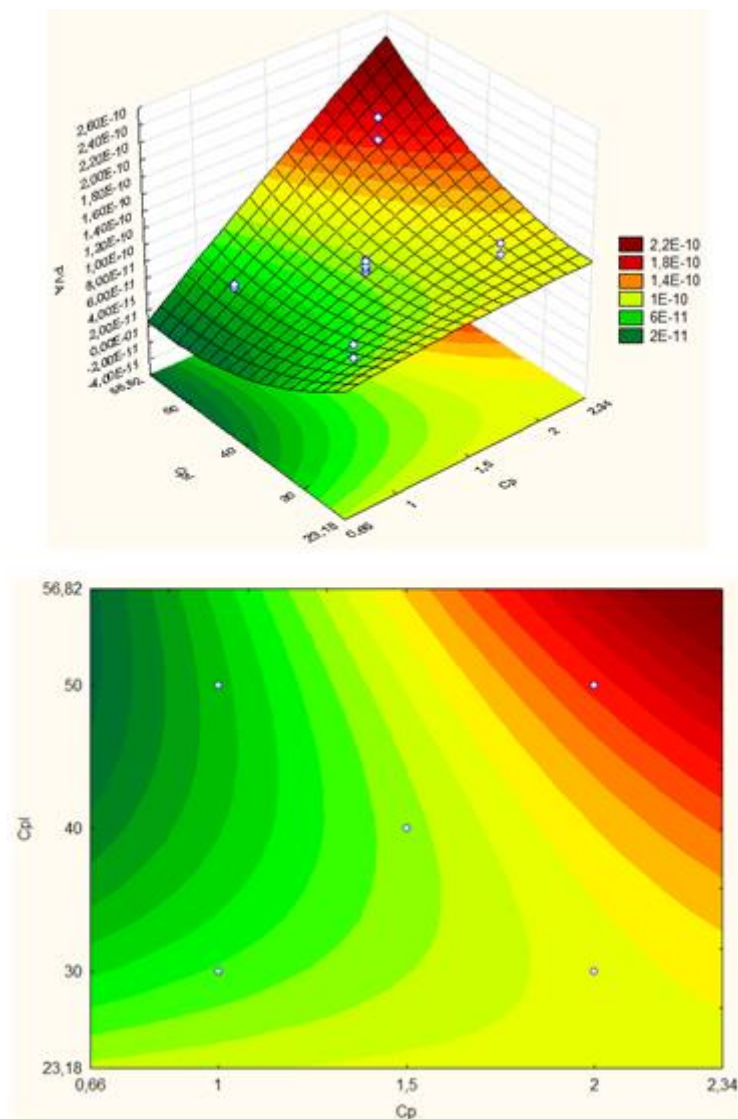


Figura 6 - Efeito da concentração de proteína (C_p) e plastificante (C_{pl}) na formação do filme em relação à permeabilidade ao vapor de água (PVA).

Analisando-se a superfície de resposta da interação entre C_p e C_{pl} (Figura 6), observa-se que existe um valor mínimo em torno de $2E^{-11}$. Na região de nível baixo (-1) para C_p , ocorre menor permeabilidade, assim como na região de nível alto (+1) para C_{pl} . Quando ambos os efeitos estão no nível alto, ocorre alta permeabilidade, o que não é recomendável para os filmes, o ideal é uma baixa higroscopicidade, conferindo melhor proteção ao vapor de água. Os maiores valores da permeabilidade ao vapor de água provavelmente estão relacionados com a abertura da macromolécula e a entrada facilitada das moléculas de glicerol na rede protéica, que, posteriormente, provoca uma fácil difusão das moléculas de água através dos filmes (SOUZA et al., 2012).

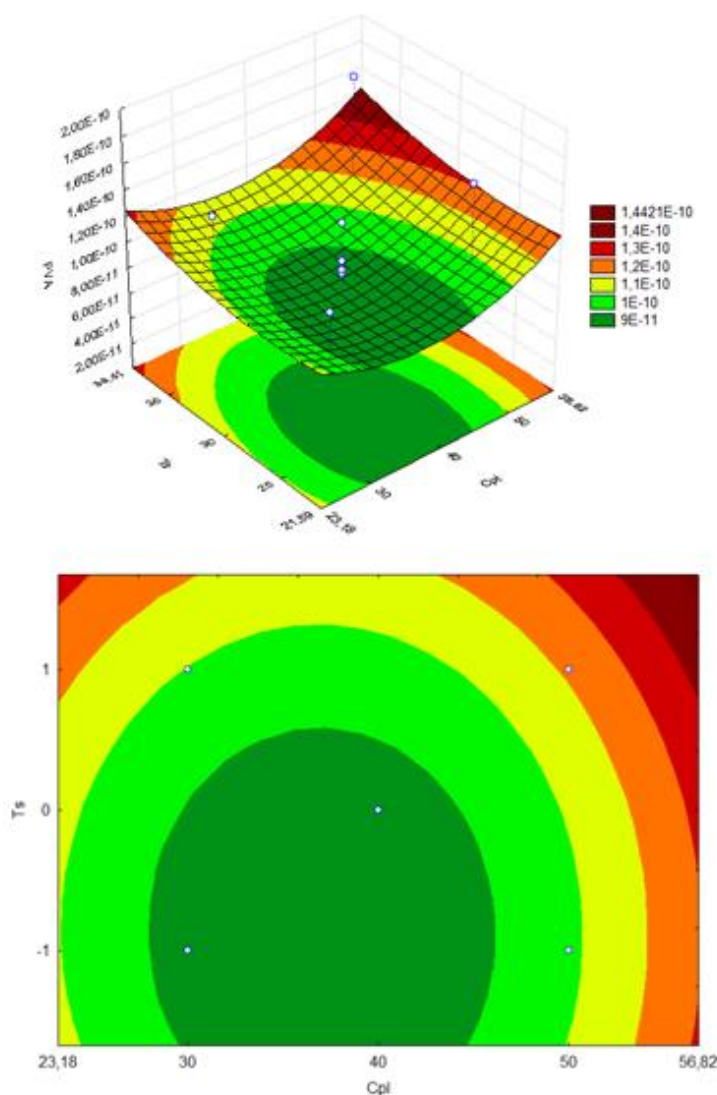


Figura 7 - Efeito da concentração de plastificante (C_{pl}) e temperatura de secagem (T_s) na formação do filme em relação à permeabilidade ao vapor de água (PVA).

Quando se observa a interação C_{pl} e T_s (Figura 7), a menor higroscopicidade encontra-se na região de nível médio (0) e nível baixo (-1) para ambos os efeitos. Já os maiores valores de PVA estão situados nos níveis alto (+1) para ambos os efeitos. De acordo com Souza et al. (2012) ao elevar a temperatura da solução formadora de filme, se favorece uma maior incorporação de plastificante devido a abertura da cadeia de proteína, cuja estrutura e organização molecular modifica, com 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.

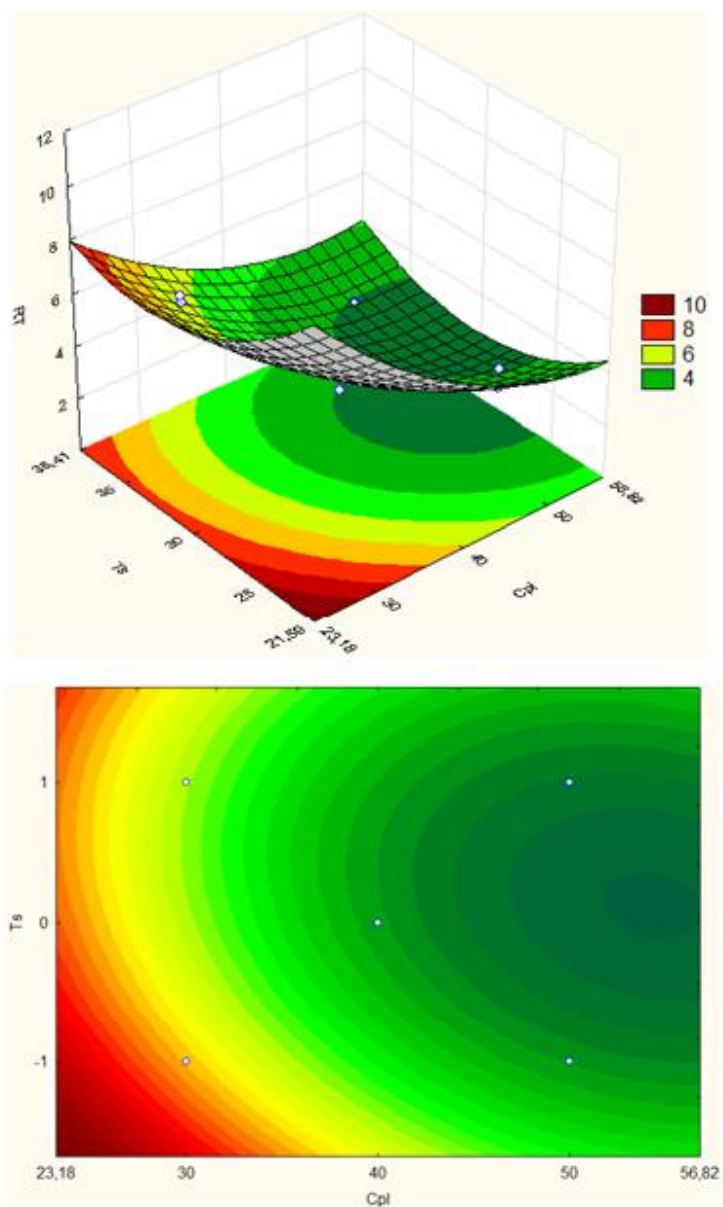


Figura 8 - Efeito da concentração de plastificante (C_{pl}) e temperatura de secagem (T_s) na formação do filme sobre a resistência à tração.

Na Figura 8, a resistência à tração, propriedade que exprime a resistência do material à perfuração (SOUZA et al., 2012), atingiu um máximo de aproximadamente 10N. Visualizando no nível baixo (-1) para C_{pl} e para

qualquer nível de T_s observa-se uma resistência alta, no entanto mais pronunciada no nível baixo (-1) para ambos os efeitos. Pode-se observar que a resistência diminuiu para 3N quando elevou-se a concentração C_{pl} para 56,82, como consequência do forte efeito dessa variável, ou seja, no nível alto (+1) para C_{pl} e no nível médio (0) para T_s tem-se baixa resistência dos filmes.

O efeito da temperatura, tratamento térmico da solução filmogênica (fixada em 50°C), contribuiu para o aumento da resistência. Segundo Ziegler e Acton (1984), o mecanismo de gelatinização das frações de miosina e actomiosina ocorrem em duas fases: em temperaturas abaixo de 50°C ocorre desnaturação protéica, enquanto que acima desta parece ocorrer agregação rápida, seguida da gelatinização.

Esse comportamento em relação à temperatura de tratamento térmico tem sido observado por outros autores que trabalharam com proteínas similares (IWATA et al., 2000; PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001; GARCIA; SOBRAL, 2005). Esses autores alegaram que o tratamento térmico, até um determinado ponto, pode favorecer a formação de pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas adjacentes, aumentando, conseqüentemente, a resistência do material.

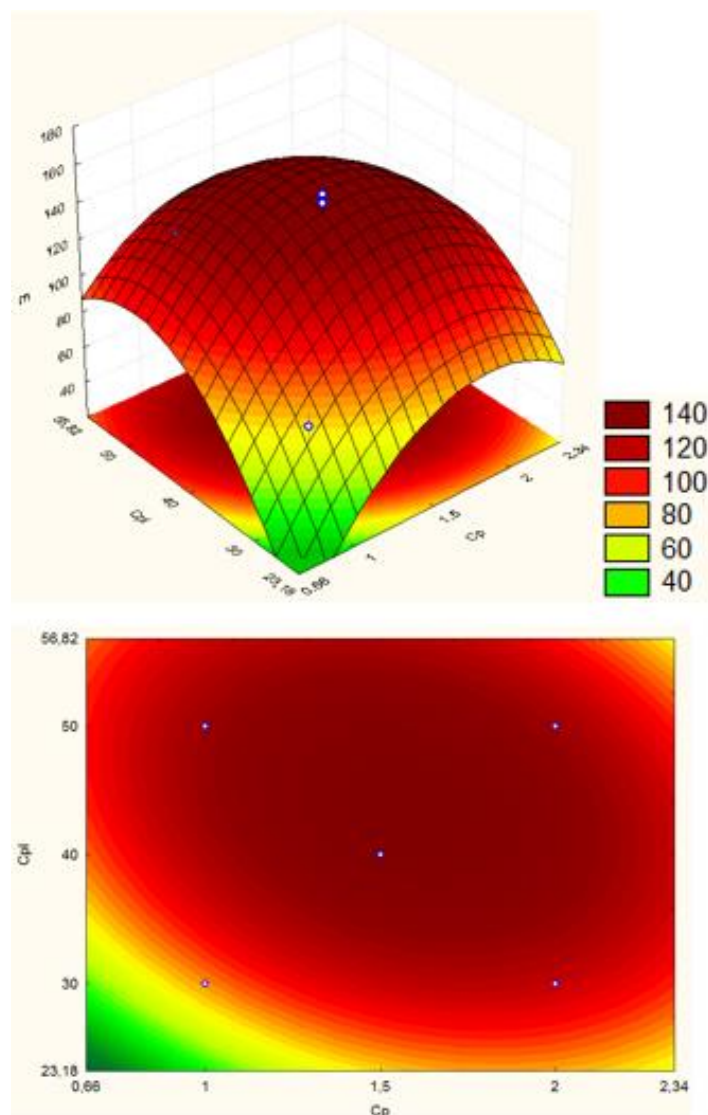


Figura 9 - Efeito da concentração de proteína (C_p) e plastificante (C_{pl}) na formação do filme sobre a elongação.

Analisando a Figura 9, a elongação foi influenciada pela concentração de C_p e de C_{pl} , onde no nível médio (0) para ambos os efeitos observa-se uma elongação alta e nos níveis baixo (-1) para ambos os efeitos obteve-se uma baixa elongação. O clássico comportamento em relação ao plastificante, ou seja, aumento da elongação na ruptura como consequência do aumento da concentração do plastificante (PASCHOALICK et al., 2003; CHIRITA, 2008) foi observado na região em concentrações de 40-50% de plastificante. Estes autores afirmam que o glicerol, plastificante hidrofílico, 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.

A presença de plastificantes e moléculas de água, considerando que o aumento do teor de glicerol aumentou a umidade final dos filmes, diminui as interações proteína-proteína, aumentando a mobilidade de cadeias polipeptídicas, permitindo os filmes menos resistentes e mais elásticos (SOBRAL et al., 2005).

5.5 OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DOS FILMES PELA FUNÇÃO DESEJABILIDADE

Ao realizar um processo biotecnológico para aplicação industrial o ideal é a obtenção de um filme que seja eficiente para ser utilizada como embalagem protetora contra alteração provocada por umidade, luz, ataque microbiano e insetos, assim como, ser biodegradável. Neste sentido, foi realizado o teste de desejabilidade para encontrar os valores das variáveis experimentais que maximizam ambas as respostas.

Na Figura 10 estão os perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e os valores otimizados dos três parâmetros experimentais selecionados.

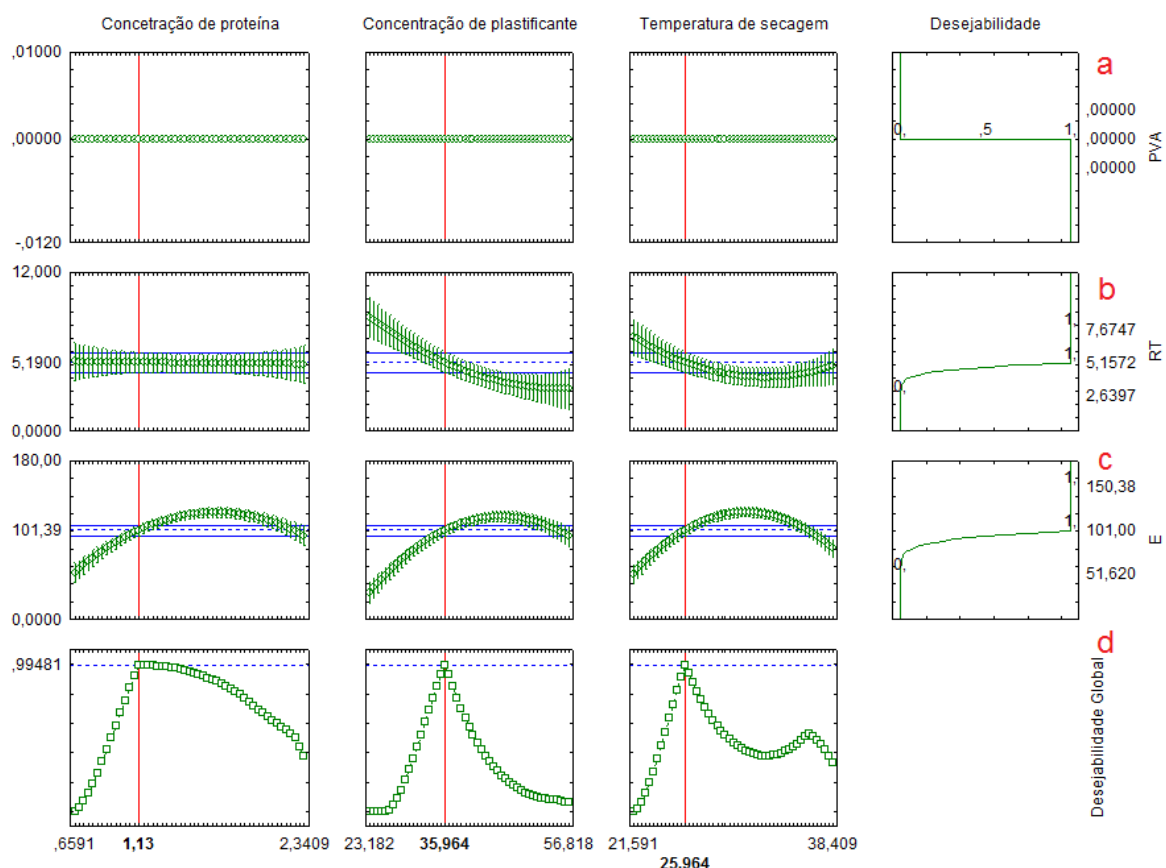


Figura 10 – Perfis de valores preditos e desejabilidade para as respostas PVA, RT e E.

Nas Figuras 10a, 10b e 10c encontram-se os valores desejáveis para os três fatores de interesse considerando o limite de confiança referente ao valor ótimo para PVA, RT e E, respectivamente. Os gráficos do quarto grupo (Figura 10d) apresentam as tendências ou projeções matemáticas reveladas pelos fatores, onde a linha horizontal azul representa o valor ótimo de resposta e a linha vertical vermelha indica em quais concentrações de proteína, plastificante e temperatura se obtém a melhor resposta. Por fim, os gráficos da última coluna mostram o perfil de desejabilidade das três respostas, PVA, RT e E, definidas de acordo com os valores escolhidos para os limites e expoentes na Tabela 3.

A análise dos resultados da função de desejabilidade evidenciou que a PVA, RT e E foram maximizadas, função global igual a 0,995, utilizando os fatores C_p , C_{pl} e T_s em 1,13%, 35,96% e 25,96°C, respectivamente. Nessas condições, os valores preditos de PVA, RT e E foram encontrados, sendo os valores experimentalmente encontrados superiores aos valores desejáveis pela

função desejabilidade (Tabela 14), ratificando que os modelos representaram de forma adequada as respostas estudadas no processo de obtenção do filme, levando em consideração os custos com produção e a viabilidade do processo.

Na Tabela 14 observamos os valores preditos e experimentais para as respostas PVA, RT e E, dentro das faixas de valores estabelecidos nos ensaios experimentais.

Tabela 14 – Respostas previstas obtidas para cada variável dependente referente à desejabilidade.

	PVA	RT	E
Preditos*	6,23E ⁻¹¹ (gm ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	5,19 (MPa)	101,39 (%)
Valor otimizado**	5,80E ⁻¹¹ ± 5,02E ⁻¹¹ (gm ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	6,31 ± 0,26 (MPa)	160,38 ± 11,55 (%)

* = Valor desejado; ** = Valor experimental

Por fim, os resultados apresentados evidenciaram que o filme biodegradável pode ser utilizado como embalagem, pois o mesmo apresentou uma baixa permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas que permitem a manutenção da integridade durante a manipulação, embalagem e transporte, aliado a uma boa transparência.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO FILME OTIMIZADO

5.6.1 Espessura e solubilidade do filme otimizado

O filme apresentou espessura de 0,035 ± 0,001 em pH 11 com 35,96% do plastificante glicerol apresentando baixo desvio padrão indicando um bom controle da espessura (SOBRAL, 2000). Em pH alcalino, a cadeia estendida facilitou o alinhamento molecular para formar uma rede ordenada devido a distribuição uniforme do glicerol na rede do filme. Devido à sua pequena molécula, glicerol não provocou a saliência da matriz do filme (ARFAT, et al., 2014). O filme formado com as proteínas miofibrilares de pescada amarela apresentou aspecto contínuo, sem fraturas, boa aparência, translúcidos, de fácil manuseio e bom aspecto tátil.

Uma ampla faixa de valores de espessuras para filmes biodegradáveis tem sido reportada na literatura e, de acordo com García et al. (2009), a espessura do filme é dependente da sua composição e dos parâmetros de processamento do filme. De acordo com Benjakul et al. (2008) encontraram valores de espessura em torno de 0,032-0,034 ao trabalharem na obtenção de filmes com proteínas miofibrilares de carapau round (*Decapterus maruadsi*). Filmes reportados por Zavareze et al. (2012) apresentaram espessuras de 0,137–0,223 ao trabalharem com proteínas miofibrilares de corvina (*Micropogonias furnieri*).

Quanto à solubilidade, o filme apresentou um valor de 27,74% $\pm$ 1,73, comprovando sua resistência em água, apresentando-se inteiro e intacto quanto à forma, flexível e dobrável ao manuseio, após permanecer imerso em água por 24h sob agitação constante, o que indica a manutenção da rede proteica. Segundo Zavareze et al. (2012) a solubilidade dos filmes depende dos componentes de sua estrutura. Proteínas com alta massa molecular são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água.

Filmes de proteína muscular de peixe são, em maioria, estabilizados por várias razões, umas delas é a ligação dissulfeto covalente (CHINABHARK et al., 2007), resultando na diminuição da solubilidade dos filmes. Arfat et al. (2014) afirma em seus estudos que filmes preparados na condição alcalina tem a solubilidade do filme reduzido, em comparação com as preparadas a pH 3. As fortes interações proteína-proteína a um pH alcalino, principalmente por intermédio de ligações dissulfeto levam à solubilidade reduzida do filme (SHIKU, HAMAGUCHI e TANAKA, 2003).

Solubilidade de filmes reportados por Zavareze et al. (2012) o valor de solubilidade foi em torno de 27-28% ao trabalharem com proteína miofibrilar de corvina (*Micropogonias furnieri*). Monterrey-Quintero e Sobral (2000) encontraram valores de 12,30-19,50% quando trabalharam com proteína miofibrilar de tilapia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

5.6.2 Cor do filme otimizado

A Tabela 15 mostra a cor do filme otimizado com alto valor de L* indicando alta luminosidade. O filme apresentou também uma falta de

tendência avermelhado e uma coloração amarelada. L^* variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* do verde (-) ao vermelho (+); e b^* do azul (-) ao amarelo (+) (GENNADIOS et al., 1996).

Tabela 15 – Cor do filme otimizado.

Parâmetro de cor	Filme otimizado
L^*	93,11 $\pm$ 0,05
a^*	-5,18 $\pm$ 0,01
b^*	8,05 $\pm$ 0,06
ΔE	2,13 $\pm$ 0,04

A tendência amarelada do filme, poderia ser devido a condição alcalina que pode induzir a formação de pigmento amarelado, especialmente por via da reação de Maillard, o pH alcalino favorece a formação redutonas sobre a produção de furfural a partir dos produtos de Amadori, que conduz ao desenvolvimento de cor em filmes (BATES et al., 1998 e TONGNUANCHAN et al., 2011b). Assim como, pode estar associado à quantidade presente de lipídeos, ainda que pequena na proteína miofibrilar liofilizada. De acordo com Tongnuanchan et al. (2011a) lipídios, principalmente lipídios de membrana, foram notificados por induzir a formação de coloração amarela, especialmente via reação de Maillard, em filmes.

Os dados obtidos neste estudo parecem indicar que os filmes de proteína tem a cor adequada para a sua utilização, como verificada através de embalagens de revestimento. Filmes reportados por Blanco-Pascual et al. (2014) apresentaram uma baixa luminosidade (33,35-34,96), falta de cor avermelhada e tendência para cor amarelada, ao trabalharem com concentrado de proteína miofibrilar de lula jumbo (*gigas de Dosidicus*).

5.6.3 A transmissão da luz e valor de transparência do filme otimizado

A transmissão de luz em intervalos de UV e visível no comprimento de onda selecionado de 200-800nm, bem como a transparência (T_{600}/nm) estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – A transmissão de luz e a transparência do filme otimizado.

Transmitância UV-Visível (nm)	Filme otimizado
200	0,002 $\pm$ 0,00
280	0,002 $\pm$ 0,00
350	0,773 $\pm$ 0,02
400	0,822 $\pm$ 0,02
500	0,857 $\pm$ 0,02
600	0,861 $\pm$ 0,01
700	0,878 $\pm$ 0,01
800	0,870 $\pm$ 0,02
Transparência (T₆₀₀)	1,864 $\pm$0,18

O filme exibiu a menor transmissão na gama dos UV (200-280 nm), o que segundo Blanco-Pascual et al. (2014) filmes dificilmente exibem transmissão de luz no espectro ultravioleta, que poderiam ser levada em consideração para evitar a oxidação dos alimentos. Desta forma, têm excelentes propriedades de barreira contra a luz UV na gama de 200-280 nm. De acordo com Hamaguchi et al. (2007) os filmes proteicos são considerados boas propriedades de barreira aos UV, devido ao seu elevado teor de aminoácidos aromáticos que absorvem luz UV. Isto é interessante, porque as maiorias das películas de polímeros sintéticos não impedem a passagem da luz UV acima de 280 nm (SHIKU et al., 2004; SHIKU, HAMAGUCHI e TANAKA, 2003).

O resíduo da pescada amarela por apresentar uma coloração branca, sem pigmentos, principalmente observado na proteína miofibrilar liofilizada, pode ter contribuído para a transparência dos filmes. Artharn et al. (2008) observaram que a maior proporção de proteína miofibrilar solubilizado deu lugar a uma maior transparência, o que está de acordo com o presente estudo. Shiku et al. (2003) afirmou que filmes de proteína muscular preparadas em pH ácido (2-3) ou alcalino (11-12) levou a redes das proteínas mais estáveis, com transparência superiores perto de filmes sintéticos. Transparência do filme alta pode ter sido favorecida pela alta solubilidade da

proteína e desnaturação de proteínas causadas por condições ácidas e alcalinas (Blanco-Pascual et al 2014).

O maior valor de transparência representa a menor transparência do filme (ARFAT et al., 2014) e a transparência do filme relatada neste estudo foi bastante satisfatória (Figura 11). Assim, valores reportados por SHIKU et al., (2003) indicam baixa transparência em filmes a base de proteína miofibrilar de peixe e filmes a base de proteínas miofibrilares da espécie Lula jumbo (*gigas de Dosidicus*) relatado por Blanco-Pascual et al. (2014; 2013) apresentaram alta transparência. Estes resultados indicam que os filmes de proteína miofibrilar são transparentes e claros o suficiente para ser usado como embalagem.



Figura 11 – Foto mostrando a transparência do filme otimizado.

5.6.4 Caracterização da microestrutura do filme otimizado (MEV)

As micrografias da superfície e da seção transversal do filme otimizado estão representados na Figura 12. Na Figura 12 (A e B) observa-se uma superfície lisa, indicando que tem a estrutura homogênea na superfície e isto foi associado com as melhores propriedades mecânicas e físicas do filme. Há também, a presença de pequenos pontos brancos distribuídos de forma homogênea, que podem ser a presença de micro bolhas, mais detalhadas na seção C e D, mas que não comprometeu as propriedades tecnológicas do filme. Esta característica de superfície lisa pode estar associada segundo Arfat

et al. (2014) que os arranjos de moléculas de proteínas durante a formação do filme pode ter se apresentado de uma única maneira.

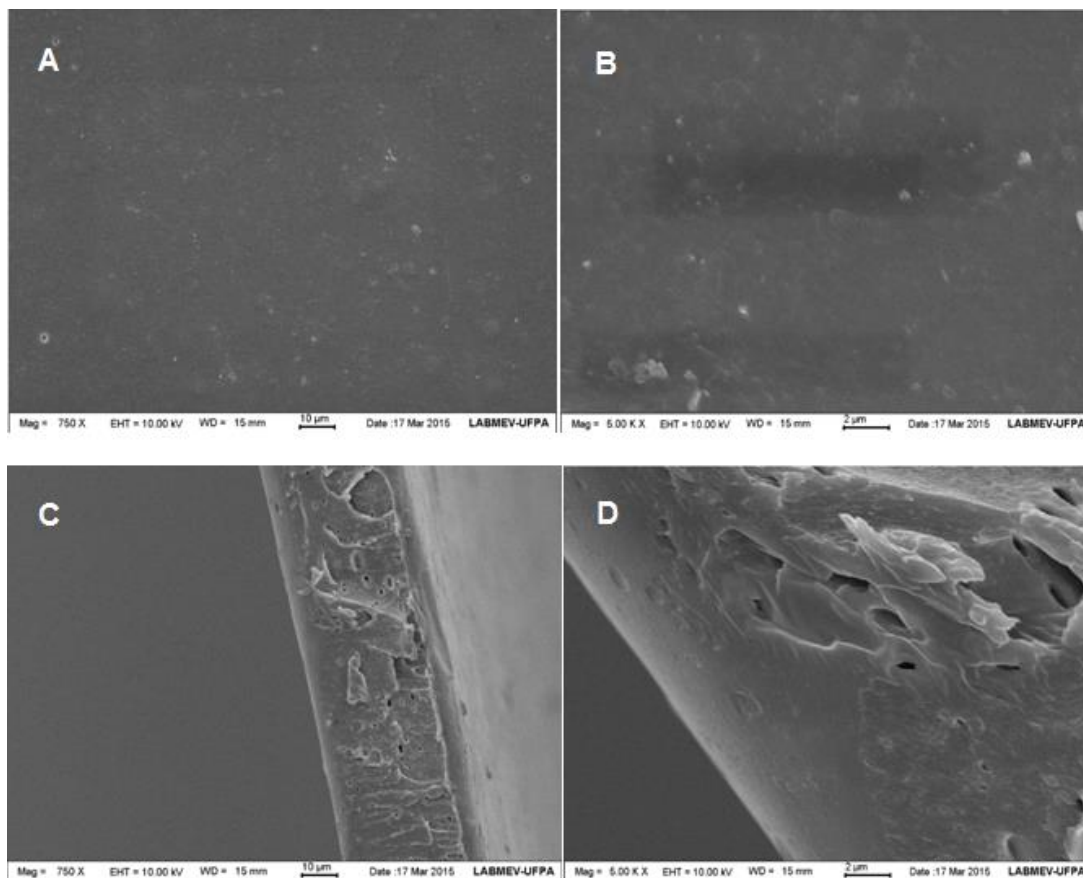


Figura 12 - Micrografias de superfície (A e B) e a seção transversal (C e D) do filme otimizado. Ampliação: 750 e 5000X para superfície e corte transversal.

Na Figura 12 (C e D) referente ao corte transversal do filme, observa-se uma estrutura descontínua e com a presença de fissuras. No entanto, a estrutura do filme apresenta-se de forma densa e compacta, indicando uma estrutura forte e resistente. Esse caráter compacto pode ser responsável pelos baixos valores de solubilidade em água apresentados pelos biofilmes de proteínas miofibrilares de pescada amarela. Gontard (1991), trabalhando com biofilmes, observou, através de micrografias, que os filmes com microestrutura mais densa e compacta apresentavam menores valores de solubilidade e permeabilidade e maior força na ruptura.

As micrografias revelam a presença de orifícios (de aproximadamente 0,1 μm) de forma elíptica que podem ser resultante de dois fatores: a permanência de micro bolhas na solução filmogênica comprimidas durante o processo de secagem ou a espaços ocupados por frações de glicerol retiradas da matriz do biofilme durante a aplicação do vácuo. O efeito do glicerol pode ser observado na micrografia da seção transversal dos biofilmes, onde se observa uma superfície mais áspera, o que indica a característica quebradiça desse filme. Essa mesma observação foi divulgada por Monterrey-Quintero e Sobral (2000) e Blanco-Pascual et al. (2014) com filmes de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo e de lula jumbo, respectivamente.

6 CONCLUSÃO

O processo de obtenção de proteína miofibrilar liofilizada (PML) de pescada amarela apresentou rendimento satisfatório, no valor de 16,8%, o que a torna uma possível fonte de matéria-prima para a indústria de biofilmes.

O perfil de aminoácidos presentes na PML apresentou todos os aminoácidos essenciais, os quais são histidina, arginina, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, felilalanina e lisina com valores de 1,53, 6,57, 4,51, 4,67, 2,94, 4,49, 7,63, 3,61 e 9,02, respectivamente. Os aminoácidos que se destacaram em maiores concentrações foram o aspartato com 9,53, o glutamato com 15,29, a lisina com 9,02 e a leucina com 7, 63.

A metodologia de superfície de resposta se mostrou uma ferramenta poderosa para otimizar os parâmetros do processo de obtenção do filme, aliada à função desejabilidade, uma vez que as respostas obtidas, $5,80E^{-11} \text{ gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ para permeabilidade, 6,31 MPa para resistência e 160,38% para elongação, referente ao ensaio realizado de acordo com esta função para verificar as propriedades de barreiras e mecânicas dos filmes, foram superiores aos valores preditos pela desejabilidade. Em que as condições experimentais dos fatores como concentração de proteína, concentração de plastificante e temperatura de secagem foram 1,13%, 35,96% e 25,96°C, respectivamente. Evidenciando a maximização para a permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e elongação com função global próximo a 1. Assim, os resultados desta otimização podem ser adaptados para a obtenção do biofilme em escala industrial.

O filme biodegradável, obtido do subproduto da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), pode ser utilizado como embalagem e colocado no mercado, visto que o mesmo trata-se de um produto biodegradável e por ter apresentado baixa permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas que permitem a manutenção da integridade do filme durante a manipulação, embalagem e transporte, aliado a uma boa transparência.

REFERÊNCIAS

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

ABABOUC L. Fisheries and Aquaculture topics. Composition of fish. Topics Fact Sheets. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department**. Rome: FAO; 2005. Disponível em <<http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en>> Acessado em 20 de março de 2014.

ACTON, J. C.; ZIEGLER, G. R.; BURGE JR., D. L. E FRONING, G. W. Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products Critical. **Reviews in Food Science & Nutrition**, 18 (2), pp. 99-121. 1982.

AKHANAZAROVA, S.; KAFAROV, V. **Experiment Optimization in Chemistry and Chemical Engineering**, Mir Publishers, Moscow, 1982.

ALFARO, A. T.; FONSECA, G. G.; BALBINOT, E.; PRENTICE, C. Characterization of wami tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) skin gelatin: microbiological, rheological and structural properties. **Food Science and Technology International**, 10 jun. 2013.

ALMEIDA, Z. S.; CAVALCANTE, A. N.; SANTOS, N. B.; NAHUM, V. J. I. Contribuição Para Gestão do Sistema de Produção Pesqueira Pescada-Amarela, *Cynoscion acoupa* (Pisces: Sciaenidae) (Lacepède, 1802) na Costa do Maranhão, Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, 22:25-38. 2009.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. (1989). **Annual book of ASTM standards**. Philadelphia, PA, USA: ASTM

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

ARFAT, Y. A.; BENJAKUL, S. PRODPRAN, T., OSAKO, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**. 39 (2014) 58-67.

ARNESEN, J. A.; GILDBERG, A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 53–7, jan. 2007.

ARTHARN, A.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. O efeito da proteína / rácios sarcoplasmáticas miofibrilares sobre as propriedades da película muscular carapau rodada de proteína à base. **Europeu de Investigação e Tecnologia de Alimentos**, 227 (1) (2008), pp. 215-222

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, p. 1179-1186, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.016>.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: EDUNICAMP, 2001.

BATES, L.; AMES, J.M.; MACDOUGALL, D.B.; TAYLOR, P.C. Célula reacção de Maillard laboratório para modelar o desenvolvimento de cor num sistema de amido-glicose lisina. **Journal of Food Science**, 63 (1998), pp. 991-996

BELIBAGLI, K. B.; SPEERS, R. A; PAULSON, A. T. Thermophysical properties of silver hake and mackerel surimi at cooking temperatures. **Journal of Food Engineer**, v.60, p.439-448, 2003.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, 71 (1) (2005), pp. 138-149

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

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

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

BLANCO-PASCUAL, N.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, M. P. Effect of different protein extracts from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. **Food Hydrocolloids** 33 (2013) 118e131.

BLANCO-PASCUAL, N.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; MONTERO, P. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. **LWT - Food Science and Technology** 55 (2014) 543e550.

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

BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Research Day in Food**, 15 (3) (2008), pp. 237-248.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function.** University of Wisconsin Technical Report, n.9, , 1973.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and modo building.** New York: Wiley and Sons, 1978.

BUENO, C. M. et al. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian journal of Food Technology**, v. 14, n. 01, p. 65–73, 17 mar. 2011.

CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**. v. 23, n. 3, p. 729–735, 2009.

CHA, D. S. e CHINNAN, M. S. Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A review. **Food Science and Nutrition**, 44: 223-237, 2004.

CHALAMAIAH, M. A.; DINESH KUMAR, B. A.; HEMALATHA, R. B.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry** 135 (2012) 3020–3038.

CHAPLIN, M. **Structure and Science.** Disponível em <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyxan.html>. Acessado em 10 de mar. 2014

CHINABHARK, K.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Efect of pH on properties of protein-based Wlm from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi. **Bioresource Technology** 98 (2007) 221–225.

CHIRITA, M. Mechanical properties of collagen biomimetic films formed in the presence of calcium, silica and chitosan. **Journal of Bionic Engineering**, Changchun, v. 5, n. 2, p. 149-158, 2008.

CORTEZ-VEJA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e Montmorilonita: Avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. **Brazilian Jornal of Food technology**. Campinas, v. 16, n. 2, p. 90-98, abr./jun. 2013 <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000011>.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Embalagens de filmes comestíveis à base de proteínas miofibrilares de peixe: propriedades de formulação e funcionais. **Journal of Food Science**, 60 (1995), pp. 1369-1374.

DAINIELLI, D.; GONTARD, N.; ZONDERVAN-VAN DEN, B. E. & TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Tecnology**, 19:103-112, 2008.

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

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

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, 27(2): 408-416, abr.-jun. 2007.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; AÑÓN, M. C.; SOBRAL, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Efeitos das condições de secagem em algumas propriedades físicas de filmes de proteína de soja. **Jornal de Engenharia de Alimentos**, 90 (2009), pp. 341-349.

EWART, H. S.; DENNIS, D.; POTVIN, M.; TILLER, C.; FANG, L.; ZHANG, R. Development of a salmon protein hydrolysate that lowers blood pressure. **European Food Research and Technology**, 229 (2009), pp. 561-569

FAO. Draft revised standard for quik frozen of fillets, minced fish flesh and mixtures of fillets and minced fish flesh (Appendix iv). **In: Report of 21st session of the code committee on fish and fishery products.** Rome, Codex Alimentarius Commission, 1994, p. 47 – 54.

FERREIRA, C. O.; NUNES, C. A.; DELGADILLO, I.; SILVA, J. A. L. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. **Food Research International**. v. 42, p. 807–813, 2009.

FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 63, p. 1061–1067, 2004.

FERRUTI, P. et al. Polycaprolactone-poly(ethylene glycol) multiblock copolymers as potential substitutes for di(ethylhexyl) phthalate in flexible poly(vinyl chloride) formulations. **Biomacromolecules**, v.4, p. 181-188, 2003.

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

FINDLAY, E.J. AND STANLEY, D.W. Differential scanning calorimetry of beef muscle: influence of sarcomere length. **Journal of Food Science**. 49:1529. 1984.

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

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

GARCÍA, M. A.; PONOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of starch and composite edible films and coatings. In: EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (Eds.). **Edible films coatings for food applications**. New York: Springer, 2009. P. 169-210. http://dx.do.org/10.1007/987-0-387-92824-1_6

GENNADIOS, A. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press. New York. 6: 159-180, 2002.

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

GIANCONE, T.; TORRIERI, E.; DI PIERRO, P.; MARINIELLO, L.; MORESI, M.; PORTA, R.; MASI, P. Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. **Journal of Food Engineering**, 89:195-2003, 2008.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1133–1143, out. 2007.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapor permeability and other physical properties. **International Journal Food Science Technology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 39-50, 1994. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb02045.x>

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

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

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

HENRY-SILVA, G. G. H.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 519-526, 2002.

HIMAYA, S. W. A.; NGO, D.-H.; RYU, B.; KIM, S.-K. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. **Food Chemistry**, 132 (2012), pp. 1872-1882

IMAM, S. H.; CINELLI, P.; GORDON, S. H.; CHIELLINI, E. Characterization of Biodegradable composite films prepared from blends of poly (vinyl alcohol), corn starch and lignocellulosic fiber. **Journal of Polymers and the Environment**, 13 (2005), pp. 47-55.

ISAAC, V.J.; ESPÍRITO-SANTO, R.V. do.; SILVA, B.B.; FRÉDOU, F.L.; MOURÃO, R.M. e FRÉDOU, T. An interdisciplinary evaluation of the Fishery Production Systems off the Para State, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, Germany, 25(3): 244-255. 2009.

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.

JOO, S. T.; KAUFFMAN, R. G.; KIM, B. C.; PARK, G. B. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. **Meat Science**, 52, pp. 291-297, 1999.

KOTAKI, S. H. **Utilização da carne mecanicamente separada (CMS) da carcaça de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para a elaboração de linguiça de peixe**. 2005. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de pesca) Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca. Fortaleza, 2005.

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

KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases e inibidores no processo de surimi. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 1, p. 5-11, 2002.

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

LAKSHMI, S.; JAYAKRISHNAN, A. Synthesis, surface properties and performance of thiosulphate-substituted plasticized poly(vinyl chloride). **Biomaterials**, v. 23, p. 4855-4862, 2002.

LAOHAKUNJIT, N.; NOOMHORM, A. Effect of plasticizers on mechanical properties of rice starch film. **Revista Agrotecnologia, Anápolis**, v.2, n.1, p.73-88, 2011 Starch/Stärke, Weinheim, v.56, n.8, p. 348-356, 2004.

LI, C.; XIONG, Y.; CHEN, J. Protein oxidation at different salt concentrations affects the cross-linking and gelation of pork myofibrillar protein catalyzed by microbial transglutaminase. **Journal of Food Science**, 78 (6), pp. 823-83, 2013.

LIMA A. M. F., ANDREANI L., BORSALI R., SOLDI V. Influência do agente plastificante e do processo de reticulação sobre a morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas dos filmes de alginato de sódio. **Quimica Nova**. 2007; 30: 832 – 837.

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

LIMPAN, N.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S.; PRASARPRAN, S. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal Food Engineering**, Essex, v. 100, n. 1, p. 85-92, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.031>

LIU, Z.; XIONG, Y. L.; CHEN, J. Morphological examinations of oxidatively stressed pork muscle and myofibrils upon salt marination and cooking to elucidate the water-binding potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59 (24), pp. 13026-13034, 2011.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, p.7055-7011, 2003.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Characterization of ferulic acid incorporated into the starch-chitosan blend films. **Food Hydrocolloids**, 22 (2008), pp. 826-835.

MATOS, I. P. M.; LUCENA, F. Description of the fishery of acoupa weakfish, *Cynoscion acoupa*, off Pará State. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, 2006, 39: 66 – 73.

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

MIYAGUCHI, Y.; NAGAYAMA, K.; TSUTSUMI, M. Thermal and functional properties of porcine sarcoplasmic proteins: A comparison with some water-soluble animal proteins. **Animal Science Journal**, 71 (4) (2000), pp. 416-424

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J. do A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) para

elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.179-189, 2000.

MOURÃO, et al. Sistema de Produção Pesqueira Pescada Amarela - *Cynoscion Acoupa*, Lacèpede (1802): Um Estudo de Caso no Litoral Nordeste do Pará – Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 35(3): 497 - 511, 2009.

MOURÃO, K. R. M. **SISTEMAS DE PRODUÇÃO PESQUEIRA DA PESCADA AMARELA (*Cynoscion acoupa* Lacèpede, 1802) E SERRA (*Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo & Zavalla-Camin, 1978) NO LITORAL NORDESTE DO ESTADO DO PARÁ**. Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Agrárias. Belém, 2007.

MURUETA, J. H. C.; TORO, M. A. N.; CARRENO, F. G. Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. **Food Chemistry**, v.100, n.2, p.705-711, outubro, 2007.

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M. DE; MARQUEZ, U. M. L. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.101-108. 2004.

OFFER, G. E TRINICK, J. On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. **Meat Science**, 8 (4), pp. 245-281, 1983.

OHLENDIECK, K. Proteomics of skeletal muscle glycolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1804, pp. 2089-2101, 2010.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. **LWT - Food Science and Technology**. 2007.

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

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

PARK, J.W.; LIN, T.M.J. **Surimi: Manufacturing and Evaluation** In: PARK, J.W. (ed.), *Surimi and Surimi Seafood*. 2º ed. London: Taylor & Francis Group, CRC, 2005. p.33-106.

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** 17 (2003) 419–427.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.1, p.57-65, 2003.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. The effect of drying temperature on the water vapor permeability and mechanical properties of milk whey protein in lipid emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48 (2000), pp. 2689-2692.

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

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol.41 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2005.

PILON, G.; RUZZIN, J.; RIOUX, L.-E.; LAVIGNE, C.; WHITE, P. J.; FRØYLAND, L. Differential effects of various fish proteins in altering body weight, adiposity, inflammatory status, and insulin sensitivity in high-fat-fed rats. **Metabolism**, 60 (2011), pp. 1122-1130

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

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

REBOUÇAS, M. C.; RODRIGUES, M. C. P.; CASTRO, R. J. S.; VIEIRA, J. M. M. Caracterização do concentrado proteico de peixe obtido a partir dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 697-704, abr. 2012.

RHIM, J. W.; NG, P. K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 47, p. 411-433, 2007. <http://x.doi.org/10.1080/10408390600846366>.

ROBERTSON, G. **Food Packaging: principles and practice**. CRC Press. Cap.1. pag.3, 2006.

ROSA, R., & NUNES, M. (2003). Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, doi: 10.1002/jsfa.1619.

SAYD, T.; MORZEL, M.; CHAMBON, C.; FRANCK, M.; FIGWER, P.; LARZUL, C. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: Implications on meat color development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54 (2006), pp. 2732-2737.

SEIBEL, N. F.; SOARES, L. A. S. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SHAW, N. B.; MONAHAN, F. J.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol, or sorbitol. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 164-167, 2002.

SHIKU, Y.; HAMAGUCHI, P.Y.; TANAKA, M. Efeito do pH sobre a preparação de películas comestíveis à base de proteínas miofibrilares peixe. **Ciência da Pesca**, 69 (5) (2003), pp. 1026-1032.

SHIKU, Y., HAMAGUCHI, P.Y., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., TANAKA, M., 2004. Effect of surimi quality on properties of edible Wlms based on Alaska pollack. **Food Chemistry**. 86, 493-499.

SHIMOMURA, Y.; YAMAMOTO, Y.; BAJOTTO, G.; SATO, J.; MURAKAMI, T.; SHIMOMURA, N.; KOBAYASHI, H.; MAWATARI, K. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. **Journal of Nutrition**, v.136, n.2, p.529S-532S, 2006a.

SILVA, A. **Estudo do processo de produção de empanados de peixe**. Dissertação Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI. 81 f. Erechim, 2006.

SILVA, L. C. C.; SILVA, J. A. DARROS-BARBOSA, R.; ROMANELLI, P. F. Avaliação da solubilidade das proteínas Miofibrilares, capacidade de emulsificação e Perda por cocção, evaporação e gotejamento Das carnes de ema, avestruz e frango. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 23, n. 4, p.647-653, out./dez. 2012.

SOARES, et al. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, 56(4):370-378, jul/ago 2009.

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

SOBRAL, P. J. A.; SANTOS, J. S.; 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** , 70 (2005) 93-100.

SOTHORNVIT, R. e KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, 50, 149-155. 2001.

SOUSA, et. al. Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos aspectos físico, químico e microbiológico. **Revista ACSA - Agropecuária Científica no Semiárido**. V. 8, n. 1, p. 19-27, jan - mar, 2012.

SOUZA, A. F. L. DE; INHAMUNS, A. J. Análise de rendimento cárneo das principais espécies de peixes comercializadas no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 289–296, 2011.

SOUZA, R.C.; SOUZA, L.A.; SILVA, B.B.; FONSECA, A.F.; IKEDA, R.G.P.; BRITO, C.S.; JÚNIOR, I.F.; FRÉDOU, F.L.; CASTRO, A.C. L.; TAVARES, R.G.C.F.; MATOS, I.P. Dinâmica de Populacional da Pescada Amarela *Cynoscion acoupa* da Costa Norte do Brasil. Relatório Final das Atividades da Subárea de Dinâmica de Populações e Avaliação de Estoques. **Programa REVIZEE**. v.2, 29p. . 2003.

SOUZA, S. M. A.; SOBRAL, P. J. A. MENEGALLI, F. C. Physical properties of edible films based on bovine myofibril proteins. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 283-296, jan./mar. 2012.

SRINIVASA P.C., RAMESH M.N., THARANATHAN R.N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films, **Food Hydrocolloids**, v.21, n.7, pp.1113–1122, 2007.

STEFANSSON, G.; HULTIN, H.O. On the solubility of cod muscle proteins in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.2656-2664, 1994.

SUN, J. G.; WU, Z.; XU, X. L.; LI, P. Effect of peanut protein isolate on functional properties of chicken salt-soluble proteins from breast and thigh muscles during heat-induced gelation. . **Meat Science**, 91, pp. 88-92, 2012.

SUN, X. D.; HOLLEY, R. A. Factors influencing gel formation by myofibrillar proteins in muscle foods Comprehensive. **Reviews in Food Science and Food Safety**, 10 (1), pp. 33-51, 2011.

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

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPYA, P. Características de película à base de proteína isolar do músculo tilápia vermelha com coloração amarela insignificante. **Jornal Internacional de macromoléculas biológicas**, 48 (2011a), pp. 758-767

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

TOM, A.; NAIR, K.S. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.136, n. p.324S-330S, 2006.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, 70 (3) (2005), pp. 493-508

UDENIGWE, C. C. et al. Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 468–475, maio 2012.

USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHERT, J.; ADAMCZYK, M. Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. **Food Chemistry** 112 (2009) 139–145.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de lingüiça fresca “tipo toscana” de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 113f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Protein concentrate from the residues left after filleting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): physical-chemical characterization and sensory acceptance. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 92-99, jan-mar, 2011.

VISENTAINER, J. V.; GOMES, S. T. M.; HAYASHI, C.; SANTOS, O. O.; SILVA, A.B. M.; JUSTI, K. C.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácido graxos em cabeças de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, 2003.

WHITE, J. A; HART, R. J.; KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of automatic hemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–7, jan. 1986.

XIONG, Y.; LOU, X.; WANG, C.; MOODY, W.; HARMON, R. Protein extraction from chicken myofibrils irrigated with various polyphosphate and NaCl solutions. **Journal of Food Science**, 65 (1), pp. 96-100, 2000.

XU, X. L.; HAN, M. Y.; FEI, Y.; ZHOU, G. H. Raman spectroscopic study of heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristic. **Meat Science**, 87, pp. 159-164, 2011.

YAN, K. L.; TAKHISTOV, P. T. & MILTZ, J. Intelligent packaging: concepts and applications. **Journal of Food Science**, 70:R1-R10, 2005.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L.M.; TELLES, A. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. **Brazilian Journal of Food Technology**, IV SSA, p. 53-57, maio 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000038>

ZIEGLER, G. R.; ACTON, J. C. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 5, p. 77-82, maio 1984.

ZURAINI, A.; SOMCHIT, M. N.; SOLIHAN, M. H.; ARIFAH, A. K.; ZAKARIA, M. S.; SOMCHIT, N.; RAJION, M. A.; ZAKARIA, Z. A.; MAT JAIS, A. M.; GOH, Y. M. Fatty acid and amino acid composition of three local Malaysian Channa spp. Fish. **Food Chemistry** 97 (2006) 674–678.