



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

**JÁIRA THAYSE SOUZA BATISTA**

**ESTUDO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES  
EXTRAÍDAS DE SUBPRODUTOS DA DOURADA (*Brachyplatystoma roussauxii*)  
COM ADIÇÃO DE QUITOSANA**

BELEM

2016



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

**JÁIRA THAYSE SOUZA BATISTA**

**ESTUDO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES  
EXTRAÍDAS DE SUBPRODUTOS DA DOURADA (*Brachyplatystoma roussauxii*)  
COM ADIÇÃO DE QUITOSANA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Lúcia de Fátima  
Henriques Lourenço

BELÉM

2016



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

**JÁIRA THAYSE SOUZA BATISTA**

DATA DA AVALIAÇÃO: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

CONCEITO: \_\_\_\_\_

**Banca examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço  
(FEA/ITEC/UFPA- Orientadora)

---

Prof. Dra. Maria Regina Sarkis Peixoto Joele  
(IFPA/Campus Castanhal – Membro interno)

---

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

---

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

BELÉM  
2016

Aos meus pais Ivone Souza e Esmael Batista e minha vó Socorro Almeida que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida.

Com amor dedico.

“Creio em mim mesmo. Creio nos que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família. Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar contanto que eu me esforce para alcançar, com meios lícitos e honestos. Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito. Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe. Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo. Não caluniarei aqueles que não gosto. Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdoarei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.”

Gandhi

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar diariamente ao longo dessa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Lourenço, por ter confiado no meu potencial, pelos ensinamentos, sugestões, críticas e atenção dispensada ao longo desses dois anos que trabalhamos juntas.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Regina Joele, Dr. Eder Araújo e Dr Antônio Rodrigues pelas valorosas contribuições.

A todos da família LAPOA. Em especial, a minha amiga Cleidiane Araújo, que sempre esteve ao meu lado me auxiliando ao longo desses dois anos e que tornou-se pra mim uma referência pessoal e profissional.

Aos demais amigos do LAPOA, em especial a Eleda Xavier, Lorena Limão, Wagner Barreto, Milena Passo, Natácia Silva, agradeço pela amizade, incentivo e colaboração.

Aos amigos que o PPGCTA me trouxe, em especial a Fernanda Wariss, Samíria Santos, Eduarda Borges, Jean Araújo, Rayane Vieira, Victor Nascimento, pela amizade e por tornarem essa caminhada mais leve.

Aos meus pais, Ivone e Esmael, por sempre me incentivarem a estudar e a lutar por meus sonhos, por nunca medirem esforços para que eu conquistasse meus objetivos, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, pelo amor incondicional, pela educação que me deram e por sempre me guiarem no caminho do bem.

A minha vó Socorro Almeida, pelo amor e carinho, por sempre estar ao meu lado e pelo o exemplo de vida. Minha eterna gratidão, amor e admiração!

A meu irmão, Marcílio, pela paciência e companheirismo.

A minha tia Ilenize Souza, pelo carinho, incentivo e paciência.

A meu namorado, Romário Campos, pela paciência, carinho e por sempre me incentivar na busca pela realização dos meus sonhos.

A toda minha família, meus avós, tios e primos, por todo o apoio e incentivo. Aos amigos Vera Lúcia, Sávia Coelho, Yasmim Moraes, Filipe Cardoso, Paulo Sérgio pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos de vida que dividimos.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Dourada ( <i>Brachyplatystoma rousseauxi</i> ).....	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b>	Fórmula geral da quitosana.....	<b>20</b>
<b>Figura 3.a</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e concentração de quitosana (Q %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>40</b>
<b>Figura 3.b</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>41</b>
<b>Figura 3.c</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA), relacionando concentração de quitosana (Q %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>41</b>
<b>Figura 4.a</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para resistencia a tração (RT), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e quitosana (Q %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>42</b>
<b>Figura 4.b</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para resistencia a tração (RT), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>43</b>
<b>Figura 4.c</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para resistencia a tração (RT), relacionando concentração de quitosana (Q %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>43</b>
<b>Figura 5.a</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para alongação (E), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e quitosana (Q %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>44</b>
<b>Figura 5.b</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para alongação (E), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>45</b>
<b>Figura 5.c</b>	Superfície de resposta e curvas de nível para alongação (E), relacionando concentração quitosana (Q %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.....	<b>45</b>
<b>Figura 6</b>	Sobreposição das curvas de contorno, resistência a tração (colorido), alongação (linha tracejada) e permeabilidade ao vapor de água (linha	<b>46</b>

	continua) para proteína miofibrilar liofilizada (PML) e quitosana (Q) na obtenção de biofilme composto.....	
<b>Figura 7</b>	Sobreposição das curvas de contorno, resistência a tração (colorido), alongação (linha tracejada) e permeabilidade ao vapor de água (linha contínua) para proteína miofibrilar liofilizada (PML) e plastificante (Q) na obtenção de biofilme composto.....	<b>47</b>
<b>Figura 8</b>	Sobreposição das curvas de contorno, resistência a tração (colorido), alongação (linha contínua) e permeabilidade ao vapor de água (linha tracejada) para quitosana (Q) e plastificante (P) na obtenção de biofilme composto.....	<b>47</b>
<b>Figura 9</b>	Comportamento das curvas de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento.....	<b>49</b>
<b>Figura 10</b>	Comportamento das curvas tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de cisalhamento (curva de fluxo).....	<b>50</b>
<b>Figura 11</b>	A: Biofilme de proteínas miofibrilares com 1,3% PML e 40% P; B: Biofilme de proteínas miofibrilares adicionado de quitosana com 1,3% de PML, 30% Q e 40% P.....	<b>56</b>
<b>Figura 12</b>	A: Curvas de TG e B: curvas de DSC para o controle (linha vermelha) com 1,3% de PML e 40% de plastificante e para o biofilme composto otimizado (linha preta) com 1,3% de PML, 30 % de quitosana e 40% de plastificante.....	<b>58</b>
<b>Figura 13</b>	Microfotografias da superfície do biofilme: A: 50X, B: 250X e C:5000X respectivamente.....	<b>59</b>
<b>Figura 14</b>	Microfotografias do corte transversal do biofilme D: 50X, E: 250X e F:5000X respectivamente.....	<b>59</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Definição dos níveis das variáveis estudadas na obtenção do biofilme composto.....	<b>28</b>
<b>Tabela 2.</b>	Planejamento fatorial completo composto central rotacional ( $2^3$ ) com valores codificados e reais.....	<b>29</b>
<b>Tabela 3.</b>	Caracterização físico-química e cor instrumental da matéria-prima e das proteínas miofibrilares liofilizadas.....	<b>34</b>
<b>Tabela 4.</b>	Resultados experimentais para otimização do biofilme composto.....	<b>36</b>
<b>Tabela 5.</b>	Estimativa dos efeitos das variáveis associada a significância para cada resposta estudada.....	<b>37</b>
<b>Tabela 6.</b>	Modelo reduzido para permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência a tração (RT) e alongação (E) em função das variáveis independentes, teste F e $R^2$ .....	<b>38</b>
<b>Tabela 7.</b>	Valores otimizados obtidos com metodologia de superfície de resposta e verificação experimental.....	<b>48</b>
<b>Tabela 8.</b>	Caracterização mecânica, física, de barreira e cor do biofilme composto otimizado.....	<b>51</b>
<b>Tabela 9.</b>	Transmissão de luz e transparência do biofilme composto otimizado.....	<b>55</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. GERAL.....	16
2.2. ESPECÍFICO.....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1. SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA.....	17
3.2. DOURADA ( <i>Brachyplatystoma roussauxii</i> ).....	18
3.3. PROTEÍNAS MIOFIBRILARES.....	19
3.4. QUITOSANA.....	20
3.5. PLASTIFICANTE.....	21
3.6. FILMES BIODEGRADÁVEIS.....	22
<b>3.6.1. Filmes compostos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.2. Mecanismo de formação do biofilme.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1. MATERIAL.....	26
<b>4.1.1. Matéria prima.....</b>	<b>26</b>
4.2. MÉTODOS.....	26
<b>4.2.1. Pré-tratamento da matéria-prima.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2. Extração das proteínas miofibrilares.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.3. Caracterização físico-química e cor instrumental da matéria prima <i>in natura</i> e das proteínas miofibrilares liofilizada.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.4. Obtenção do biofilme composto.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.5. Delineamento Composto Central Rotacional.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.6. Caracterização reológica da solução filmogênica.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.7. Caracterização do biofilme composto.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.7.1. Espessura.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.7.2. Propriedades mecânicas.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.7.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.7.4. Solubilidade e intumescimento.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2.7.5. Transmissão de luz e transparência.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2.7.6. Cor.....</b>	<b>32</b>

4.2.7.7. Análises térmicas.....	32
4.2.7.8. Caracterização microscópica da superfície e secção transversal.....	33
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADAS.....	34
5.1.1. Caracterização físico-química e cor instrumental da matéria-prima e das proteínas miofibrilares liofilizadas.....	34
5.2. DEFINIÇÕES DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DO BIOFILME COMPOSTO.....	35
5.2.1. ESTIMATIVA DOS EFEITOS.....	36
5.3. GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	40
5.3.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	40
5.3.2. Resistência a tração (RT).....	42
5.3.3. Elongação (E).....	44
5.4. SOBREPOSIÇÃO DOS GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E ESCOLHA DO PONTO ÓTIMO.....	46
5.5. CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS.....	48
5.6. CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME COMPOSTO OTIMIZADO.....	51
5.6.1. Espessura.....	51
5.6.2. Propriedades mecânicas: força na ruptura, resistência a tração e alongação.....	52
5.6.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	53
5.6.4. Solubilidade e intumescimento.....	54
5.6.5. Transmissão de luz e transparência.....	55
5.6.6. Cor.....	56
5.6.7. Análises térmicas.....	57
5.6.8. Caracterização microscópica da superfície e secção transversal.....	59
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS .....	62

## RESUMO

Problemas ambientais causados por embalagens sintéticas ocasionaram um crescente interesse no desenvolvimento de filmes biodegradáveis que são geralmente obtidos a partir de polímeros como polissacarídeos, proteínas e lipídeos, utilizados para auxiliar na manutenção da qualidade e vida útil dos alimentos. Os subprodutos gerados na cadeia produtiva do pescado possuem alto teor de proteínas miofibrilares que apresentam excelente propriedade filmogênica, formando filmes com boa resistência e elasticidade, no entanto, sua barreira ao vapor de água é baixa. A associação de biopolímeros tem sido vista como uma boa possibilidade de melhorar as propriedades dos biofilmes, e a quitosana tem sido muito utilizada com essa finalidade por ser um biopolímero natural, possuir biocompatibilidade, biodegradabilidade e nenhuma toxicidade. O objetivo desse trabalho foi estudar as características reológicas e as propriedades físicas e mecânicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir das proteínas miofibrilares de subprodutos de dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*) com adição de quitosana. Foi realizada a caracterização do subproduto e das proteínas liofilizadas indicando que a matéria prima apresentou elevada concentração de proteínas miofibrilares (94,92%), importante para a formação da matriz biopolimérica. Realizou-se um planejamento fatorial completo para definir a região de melhores propriedades mecânicas, física e de barreira dos filmes. O biofilme otimizado foi elaborado com 1,3 % de PML, 30% Q e 40% de plastificante. O estudo reológico demonstrou que a adição da quitosana aumentou a viscosidade da solução deixando a estrutura interna do fluido mais resistente ao escoamento, caracterizando-se como fluido não Newtoniano com particularidades de pseudoplástico. A adição de quitosana também provocou um aumento significativo nas propriedades mecânicas do biofilme, apresentando 322,280 % de alongação e 6,575 MPa de resistência a tração, produzindo filmes mais fortes e flexíveis, quando comparado ao filme somente de proteínas miofibrilares. A adição do polissacarídeo não melhorou a permeabilidade ao vapor de água, mas reduziu consideravelmente a solubilidade e intumescimento dos biofilmes. Os valores de transparência foram elevados, indicando tendência ao opaco, no entanto, com excelentes propriedades de barreira UV podendo ser utilizado em alimentos sensíveis a luz. O biofilme também apresentou boa estabilidade térmica e a microestrutura revelou estrutura pouco homogênea, porém coesa e densa, produzindo um novo material com melhores propriedades.

**Palavras-chave:** Biofilme, Proteínas miofibrilares, Quitosana.

## ABSTRACT

Environmental problems caused by packaging synthetic caused an increasing interest in developing biodegradable films are generally obtained from polymers such as polysaccharides, proteins and lipids and used to assist in maintaining the quality and shelf life of foods. The by-products generated in the fish production chain have high content of myofibrillar proteins that exhibit excellent filmogenic property, forming films with good strength and elasticity, however, a barrier to water vapor is low. The biopolymers association has been seen as a good opportunity to improve the properties of biofilms, and chitosan has been widely used for this purpose because it is a natural biopolymer, have biocompatibility, biodegradability and no toxicity. The objective of this work was to study the rheological characteristics and the physical and mechanical properties of biodegradable films produced from the myofibrillar protein Golden products (*Brachyplatystoma roussauxii*) with the addition of chitosan. characterization by product and lyophilized proteins indicating that the raw material had a high concentration of myofibrillar proteins was performed (94.92%), important for the formation of the biopolymer matrix. This was a complete factorial design to set the region for better mechanical properties, physical and movies barrier. The optimized biofilm was prepared with 1.3% of PML, Q 30% and 40% plasticizer. The rheological study demonstrated that the addition of chitosan increased the viscosity of the solution leaving the internal structure more resistant to fluid flow, and characterized as non-Newtonian fluid with pseudoplastic particularities. The addition of chitosan also caused a significant increase in the mechanical properties of the biofilm, with 322.280% elongation and 6,575 MPa tensile strength, producing stronger and flexible films when compared to the movie myofibrillar proteins only. The addition of the polysaccharide not improved permeability to water vapor, but greatly reduced the solubility and swelling of biofilms. The transparency values were high, indicating a tendency to dull, however, with excellent UV barrier properties can be used in food sensitive to light. The biofilm also showed good thermal stability and microstructure revealed a heterogenous structure, but dense and cohesive producing a new material with improved properties.

**Keywords:** Biofilm, myofibrillar proteins, Chitosan,

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a RDC nº 91/2001, embalagem de alimentos é definida como artigo que está em contato direto com os alimentos, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, alterações, contaminações e adulterações desde a sua fabricação até sua entrega ao consumidor.

Devido aos problemas ambientais causados pelas embalagens não biodegradáveis, há um crescente interesse em filmes elaborados com polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, que geralmente tem como base polissacarídeos, proteínas e lipídeos (DUTTA *et al.*, 2009).

De forma geral, filmes são estruturas utilizadas para envolver produtos e quando são completamente degradados por micro-organismos são considerados biodegradáveis, sendo denominados biofilmes ou filmes biodegradáveis (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

Os filmes biodegradáveis bem como os sintéticos, destinam-se a auxiliar na manutenção da qualidade e vida útil dos alimentos, controlando a transferência de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, entre outros. Porém, a maior parte das embalagens sintéticas são feitas de plásticos que apresentam boas propriedades mecânicas e eficácia como barreira ao oxigênio e a água, no entanto, sua utilização representa sérios problemas ao meio ambiente. Neste contexto, filmes de origem biológica estão sendo vistos como uma boa alternativa, podendo ser utilizado como revestimento para manter a qualidade dos alimentos, e ao mesmo tempo, reduzir o impacto ambiental causado pelos resíduos de embalagens de derivados de petróleo (SHAW *et al.*, 2002; THARANATHAN, 2003; DUTTA *et al.*, 2009; HOQUE *et al.*, 2010; PIRES *et al.*, 2011).

A cadeia produtiva do pescado gera quantidade significativa de subprodutos, desde a produção até a comercialização, e o setor ainda é carente de técnicas de processamento que visem o aproveitamento para a obtenção de co-produtos de qualidade, minimizando o impacto ambiental (SUCASAS, 2011; AGUIAR; GOULART, 2013). Esses subprodutos possuem alto teor de proteínas de elevado valor biológico e composição rica em aminoácidos. As proteínas miofibrilares, apresentam excelente propriedade filmogênica, pois sob certas condições de temperatura e pH são capazes de formar uma matriz contínua, sendo possível a produção de material fino e flexível, ou seja, de filmes flexíveis (CUQ *et al.*, 1995; GONÇALVES, 2011; NEVES *et al.*, 2004; FAO, 2007).

O biofilme formado com essa base biológica apresenta propriedades funcionais interessantes como a habilidade para formar redes com boa plasticidade e elasticidade, além de apresentar barreira ao oxigênio. No entanto, sua barreira ao vapor de água é baixa em razão da sua natureza hidrofílica (ZAVAREZE *et al.*, 2012).

Inúmeras pesquisas (BERTAN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009; PORTA *et al.*, 2011; HOSSEINI *et al.*, 2012; ARFAT *et al.*, 2014) têm sido realizadas visando melhorar as características dos biofilmes, como o aumento na resistência à tensão e diminuição da permeabilidade ao vapor de água (LEE *et al.*, 2004).

Uma das estratégias eficazes para melhorar tais características mantendo sua biodegradabilidade, é a elaboração de filmes com associação de biopolímeros que exibem propriedades filmogênicas e que sejam de fontes renováveis. A quitosana tem sido muito utilizada para essa finalidade por ser um biopolímero natural, obtido por desacetilação da quitina e quando comparado com outros polissacarídeos se destaca por possuir biocompatibilidade, biodegradabilidade e nenhuma toxicidade, além de apresentar propriedades funcionais como antibacteriana e antifúngica (SHAHID *et al.*, 1999; DUTTA *et al.*, 2009).

Segundo Wu *et al.* (2002), a mistura de proteína de peixe com outros biopolímeros miscíveis, melhorou a resistência e flexibilidade do filme e demandou menor quantidade de plastificante, apresentando-se como uma alternativa mais barata e eficaz, sendo uma boa possibilidade de melhorar as propriedades dos filmes elaborados com proteínas pela combinação das características mais desejáveis de cada componente.

## 1. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Estudar as características reológicas e as propriedades físicas e mecânicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir das proteínas miofibrilares de subprodutos da dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*) com adição de quitosana.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar as características físicas e químicas dos subprodutos da Dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*);
- Extrair a proteínas miofibrilares do subproduto da Dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*);
- Avaliar as características físico-químicas das proteínas miofibrilares liofilizada;
- Otimizar a obtenção do filme biodegradável de proteínas miofibrilares extraídas do peixe adicionado de quitosana;
- Analisar as características reológicas da solução filmogênica do filme otimizado;
- Analisar as características, físicas, mecânicas e de barreira do filme otimizado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA

A norma Brasileira NBR 10.004 (ABNT, 2004), refere-se a resíduo como todos os compostos de características sólidas ou semissólidas resultantes de vários segmentos da indústria, do comércio e dos sistemas de produção agrícola e animal. Nesse contexto, é considerado subproduto do beneficiamento do pescado, toda a fração que não é utilizada como produto principal, mas contém características químicas semelhantes às da fração comercializada (SOUZA, 2011).

Aproximadamente 60% do pescado processado é responsável pela geração de subproduto, enquanto apenas 40% é designado para a alimentação humana (CHALAMAIAH *et al.*, 2012). Em nível mundial, 17% da proteína animal consumida é proveniente da pesca e o seu beneficiamento constitui uma das principais atividades econômicas de diversos países (TAHERGOABI *et al.*, 2013; FAO, 2014).

O crescimento do número de consumidores cada vez mais seletivos quanto a qualidade e praticidade dos produtos comercializados tem causado um conseqüente aperfeiçoamento das indústrias, que vem desenvolvendo processamentos mais complexos sobre a matéria-prima para dispô-la no mercado com maior atratividade. Isso as torna, também, responsáveis pela geração de subprodutos industriais considerados poluentes para o meio ambiente caso não sejam tratados adequadamente (LIMA, 2013).

Os subprodutos sólidos da indústria pesqueira são classificados em dois grupos, considerados adequados e não adequados para a produção de co-produtos utilizados na alimentação humana. As vísceras, escamas, pele e esqueleto, incluindo a cabeça são matérias-primas utilizadas na fabricação de farinhas, óleos, silagens e compostagens de peixes, constituem o primeiro grupo que é comumente usada na alimentação animal. O segundo grupo, é constituído principalmente pela carcaça com carne aderida após a retirada do filé e pelas aparas obtidas durante o toalete dos filés, estes, são submetidos a processos para obtenção da polpa de peixe, principal ingrediente na fabricação de empanados e embutidos, para uso na alimentação humana (KUBITZA; CAMPOS, 2006; VIDOTTI, 2011).

A transformação de materiais poluentes em co-produtos com valor agregado é o alicerce para o desenvolvimento sustentável moderno, promover a reciclagem destes subprodutos é condição importante para garantia de processos mais econômicos e de menores danos ambientais (LIMA, 2013). Diante dessa necessidade, a comunidade científica especializada está utilizando estes subprodutos e buscando alternativas para o seu

reaproveitamento com o objetivo de gerar novos produtos com diferentes aplicações (BEZERRA *et al.*, 2001).

### 3.2. DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxii*)

É um peixe de ordem Siluriformes e família Pimelodidae, a dourada como é mais conhecida, é um bagre (>50 cm) que habita os canais dos principais rios da bacia amazônica, ocorrendo inclusive na bacia do rio Orinoco. É uma das espécies mais importantes para a pesca comercial e artesanal da região, sendo capturada em seis países: Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela e Equador (BARTHEM; GOULDING, 1997).

Dentre as variedades de peixes que existem na Amazônia, esta é um dos alvos preferenciais da pesca em quase toda a área de distribuição. Essa espécie realiza longas viagens (mais de 300 km), no eixo Solimões-Amazonas para completar o seu ciclo de vida. Nasceram e se reproduzem no alto das cabeceiras de vários braços (afluentes) dos rios Solimões- Amazonas, como os rios Juruá, Purus, Madeira, Içá, Japurá e outros. Alimentam-se no estuário em Belém, e crescem na Amazônia Central (de Almeirim/Santarém, até Manaus). Para a reprodução, migram numa viagem de volta aos afluentes onde provavelmente nasceram (PROVÁRZEA, 2005).

A dourada (Figura 1) é um peixe de grande porte, sendo que o maior tamanho conhecido é 192 cm. Possui como principais características morfológicas a cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos. Diferencia-se das demais espécies do Gênero *Brachyplatystoma* não só pela cor, mas também pelos tamanhos dos barbilhões e pela mandíbula e maxilar do mesmo tamanho (FERREIRA *et al.*, 1988).



**Figura 1** - Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*)

**Fonte:** Batista, 2003

Tem como características, tamanho grande, longos períodos de vida, baixa taxa de crescimento, alta sobrevivência de adultos, baixa mortalidade natural, época de reprodução cíclica, dura de dois a três meses durante a cheia de cada ano, os ambientes utilizados pela

espécie variam sazonalmente e seu mecanismo de dispersão e migração são amplos (ALONSO, 2002).

A pesca de bagres (incluindo a dourada) em toda a calha dos rios Solimões-Amazonas é uma atividade ligada principalmente à indústria pesqueira, representada pelos frigoríficos e essa atividade oferece mercado de trabalho para cerca de 16.000 pescadores na região Amazônica (BARTHEM; GOULDING, 1997).

### 3.3. PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Segundo Fennema (2010), as proteínas têm como propriedades funcionais proporcionar viscosidade, gelatinização e texturização aos alimentos. O músculo do pescado pode conter em média 20% de proteínas, 60 a 85% de umidade, 1 a 2 % de cinzas, 0,3 a 1 % de carboidratos e 0 a 36 % de lipídios. A variação desses componentes se dá em função da espécie e em indivíduos da mesma espécie, pelo tipo de músculo corporal, sexo, idade, época do ano, habitat, dieta e outros fatores.

As proteínas no pescado podem ser divididas em três grupos, baseado na solubilidade. Cerca de 10 a 20% das proteínas do músculo de peixe são proteínas sarcoplasmáticas solúveis em água, encontradas principalmente no plasma celular. Ao redor de 70 a 80% são proteínas estruturais formadas pelas proteínas miofibrilares que são solúveis em soluções salinas e formadoras das miofibrilas, responsáveis pela atividade muscular, e são compostas principalmente pela actina e miosina e cerca de 2 a 3% das proteínas estruturais são insolúveis em soluções salinas e formam o tecido conectivo, sendo compostas principalmente pelo colágeno (SUZUKI, 1987; OGAWA; MAIA, 1999; KUHN; SOARES, 2002).

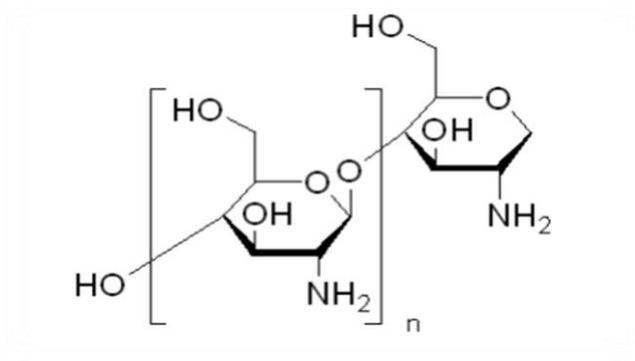
As proteínas do pescado apresentam maior digestibilidade que as proteínas do músculo de mamíferos e melhor balanceamento de aminoácidos que as proteínas de origem vegetal. Apresentam elevado valor biológico decorrente da alta sensibilidade à hidrólise e da composição balanceada em aminoácidos essenciais, principalmente lisina e metionina. A alta sensibilidade à hidrólise se dá pelo fato das proteínas musculares do pescado serem principalmente representadas pelas proteínas miofibrilares, tais como, miosina e actina (NEVES *et al.*, 2004; PIRESTANI *et al.*, 2009; JABEEN; CHAUNDHRY, 2011; HEMUNG; CHIN, 2013).

A miosina constitui de 50 a 60% da fração miofibrilar e a actina de 15 a 20%, juntas formam a actomiosina e estão contidas nas células musculares formadora dos tecidos esqueléticos, responsáveis pelo fenômeno de contração e relaxamento muscular durante a vida e após a morte do pescado, também são responsáveis pelas propriedades emulsificantes e de

maciez da carne, pela capacidade do pescado em reter água, pelas propriedades sensoriais e também pela capacidade de formação de gel. São normalmente insolúveis em água, mas podem ser solubilizadas controlando-se o pH da solução. Essas proteínas apresentam cadeias de polipeptídeos fortemente associadas entre si, em estruturas paralelas. São capazes de formar filmes biodegradáveis e tem sido motivo de inúmeras pesquisas (OGAWA, 1999; IWATA *et al.*, 2000; KUHN; SOARES, 2002; PAULO *et al.*, 2004).

### 3.4. QUITOSANA

A quitosana é um polímero natural, abundante e de ampla aplicação e é considerado o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza. Derivada do processo de desacetilação da quitina, sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino- 2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina). A quitosana há décadas tem sido considerada como um composto de grande interesse industrial devido suas características atóxicas e de fácil formação de géis (ASSIS; ALVES, 2002; ARANAZ *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Formula geral da quitosana

**Fonte:** Cordeiro, 2010

Por possuir propriedade única de aumentar sua viscosidade após hidratação, além de sua habilidade em formar filmes resistentes, materiais à base de quitosana podem ser utilizados como películas ou revestimentos em alimentos (JEON *et al.*, 2002). Esse polissacarídeo policatiônico possui também outras propriedades apreciáveis pela indústria de alimentos, não é tóxico e tem atividade antimicrobiana, além de ser biocompatível, biodegradável e anti-oxidante (DI PIERO; GARDA, 2008).

Estas características da quitosana tem atraído muito a atenção como um aditivo alimentar natural, além de seu potencial na produção de películas e revestimentos

biodegradáveis atuando como barreira contra agentes externos (TUAL *et al.*, 2000; SATHIVEL *et al.*, 2007).

A produção de quitosana tradicional envolve desproteínização, desmineralização, desodorização, e desacetilização. O processo de desacetilação consiste na remoção da maioria dos radicais acetilas da estrutura e substituição dos mesmos por um átomo de hidrogênio, resultando em um radical amina. Portanto, os polímeros desacetilados, com grau de desacetilação acima de 50% podem ser considerados quitosana (LIMA, 2010).

A quitosana não é solúvel em água, mas se dissolve em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como os ácidos acético, fórmico e cítrico e também em ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico diluído (SANTOS *et al.*, 2003).

O filme obtido a partir da quitosana é flexível, durável, forte, resistente e difícil de rasgar, tem valores moderados de permeabilidade ao oxigênio, diminui a taxa respiratória do alimento e inibe o crescimento microbiano (AGULLÓ *et al.*, 2003).

### 3.5. PLASTIFICANTE

Plastificante é definido como uma substância que é incorporada a um material com intuito de melhorar a sua flexibilidade e funcionalidade, reduzindo a tensão de deformação, dureza e viscosidade, ao mesmo tempo em que aumenta a flexibilidade da cadeia do polímero e a sua resistência a fratura (HORN, 2012).

Filmes biodegradáveis elaborados somente com a matriz formadora de filme sem qualquer aditivo tendem a ser quebradiços e difíceis de manusear. Como alternativa são adicionados plastificantes para aumentar sua flexibilidade. (BANKER, 1966; SCHROOYEN *et al.*, 2001). É importante que o plastificante seja compatível com o polímero e o solvente utilizado, ou seja, que seja miscível para que não ocorra uma separação prematura durante o processo de secagem do filme (GUILBERT, 1986). Diversos materiais plastificantes podem ser adicionados aos filmes, como os mono e oligossacarídeos (glicose, sacarose), lipídios (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e surfactantes) e os polióis (glicerol, sorbitol, eritritol). Dentre eles, os polióis Glicerol e Sorbitol são os mais utilizados em filmes de proteína. (HORN, 2012).

O glicerol é um composto orgânico, líquido a temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. Está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal na sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido esteárico, oleico, palmítico e láurico formando a molécula de triacilglicerol. É um dos agentes plastificantes mais utilizados na composição de soluções filmogênicas, devido a sua

estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas dos biofilmes (BOBBIO e BOBBIO, 2003; CHILLO *et al.*, 2008).

Para explicar o efeito dos plastificantes na formação dos filmes biodegradáveis, duas teorias são principalmente utilizadas, a teoria do gel e a do volume livre. A primeira diz respeito à estrutura tridimensional dos polímeros, onde as moléculas do plastificante ligam-se ao longo da estrutura do polímero, reduzindo a rigidez da estrutura por enfraquecer ou impedir ligações de tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, ligações covalentes dentre outras, e também facilitam o movimento das moléculas do polímero, o que resulta no aumento da flexibilidade do gel, a segunda teoria trata da capacidade do plastificante em ocupar os espaços intermoleculares livres do polímero, o que também resulta em uma maior flexibilidade do filme formado (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). Com isso, ocorre uma melhora nas características mecânicas do filme e diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças (KROCHTA *et al.*, 1994).

### 3.6. FILMES BIODEGRADÁVEIS

Na conservação de alimentos, além dos tratamentos físicos ou químicos para estender seu tempo de prateleira, também é importante a utilização de embalagens adequadas, rígidas e/ou flexíveis, no entanto, muitas embalagens flexíveis são feitas com plásticos, ou seja, materiais sintéticos, que apesar de possuírem excelentes propriedades funcionais, são considerados não biodegradáveis e constantemente estão envolvidos em problemas com gerenciamento de resíduo sólidos, causando prejuízo ao meio ambiente. O polietileno, por exemplo, tem seu tempo de biodegradação estimado em 200 anos (TORRES, 1994).

Uma crescente conscientização ambiental dos consumidores tem gerado a necessidade de desenvolvimento de tecnologias específicas que atendam a exigência por produtos que utilizam materiais renováveis e ecologicamente amigáveis. Os revestimentos de frutas e legumes com filmes biodegradáveis tem chamado a atenção do seguimento de embalagem e se apresentado como uma boa oportunidade para a criação de novos mercados no setor (ASSIS; ALVES, 2002).

Os filmes biodegradáveis podem ser de dois tipos: coberturas, quando são aplicados diretamente na superfície dos alimentos, e filmes, que possuem a capacidade de formar estruturas próprias independentes. Ambos são definidos como uma fina camada contínua formada ou depositada no alimento, preparada a partir de materiais biológicos, que age como barreira a elementos externos, protegendo o alimento e aumentando sua vida comercial (KROCHTA; MULDER – JOHNSTON, 1997).

Os materiais mais utilizados para a elaboração de filmes são misturas de lipídeos, proteínas, carboidratos, plasticizantes, surfactantes, aditivos e solventes, sendo necessário, pelo menos, um biopolímero que tenha a capacidade de formar uma matriz contínua, homogênea e coesa (GONTARD; GUILBERT, 1996; AMARANTE; BANKS, 2001). Devido a sua boa habilidade de formação de película, proteínas de diferentes fontes estão sendo amplamente utilizada para o desenvolvimento desses biofilmes (OU *et al.*, 2005; PRODPRAN *et al.*, 2007).

As propriedades dos filmes irão depender de vários fatores, tais como, o tipo e a concentração de proteína que é o agente formador do filme, o solvente, o plastificante, o agente ajustador de pH da solução de proteína, e as condições de preparo (CUQ *et al.*, 1995; GERRARD, 2002; PRODPRAN *et al.*, 2007).

Quando se utiliza alta concentração de proteínas na solução filmogênica, essa se torna muito viscosa, comportando-se como fluido de Bingham, isto é, que não flui sobre a força do próprio peso, assim, é necessário trabalhar com menores concentrações de proteínas na solução formadora do filme (SOBRAL, 2000).

As proteínas miofibrilares sozinhas formam películas quebradiças, devido à presença de fortes ligações covalentes, principalmente dissulfeto, e nessas condições, não tem aplicação prática. Para aumentar a flexibilidade dessas películas é adicionado um plastificante hidrofílico, com baixo peso molecular e não volátil, objetivando que o filme reduza as interações proteína-proteína, ocorrendo um aumento da resistência mecânica do filme e a diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças. No entanto, o plastificante adicionado também diminui a força e a propriedade de barreira ao vapor de água dos filmes. Nesse contexto, as misturas de proteínas com outros polímeros miscíveis ou polímeros sintéticos, está sendo vista como uma alternativa para melhorar as propriedades de filmes (GOUNGA *et al.*, 2007; CUQ *et al.*, 1995).

O pH é um fator importante e necessita ser ajustado para mais alto ou mais baixo do que o ponto isoelétrico (PI) da proteína para completar a solubilização permitindo sua geleificação (IWATA *et al.*, 2000).

O tratamento térmico também é importante, visto que praticamente todos os estudos mostram a necessidade de uma desnaturação e desdobramento da proteína como passos prévios para interações ordenadas proteína-proteína e formação de agregados proteicos. Na maioria dos casos é indispensável um tratamento térmico para se conseguir a geleificação, podendo necessitar um resfriamento posterior (WOLF, 2007). Esse tratamento pode favorecer as interações intermoleculares via formação de pontes dissulfídicas, beneficiando as

propriedades físicas que dependem disso, como as propriedades mecânicas (SOUZA *et al.*, 2012).

Os biofilmes formados a partir de proteínas possuem baixa barreira ao vapor de água baixa em razão da sua natureza hidrofílica, desta forma, as propriedades funcionais dos filmes biodegradáveis, ainda são inferiores àsquelas de plásticos sintéticos, gerando a necessidade de mais investigação a fim de melhorar suas características (GONTARD; GUILBERT, 1996; DUTTA *et al.*, 2009; ZAVAREZE *et al.*, 2012).

### **3.6.1. Filmes compostos**

Segundo Avérous *et al.* (2001), quando uma matéria-prima não preenche alguns requisitos para determinadas aplicações do filme que ela forma, há duas alternativas a serem tomadas: modificar sua cadeia estrutural ou adicionar outras matérias-primas capazes de suprir as deficiências necessárias, neste último caso, em que o elemento adicionado tem como objetivo melhorar as propriedades físicas e mecânicas, os filmes formados são denominados de filmes compostos.

Nesse contexto se inclui os filmes obtidos a partir das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas do músculo do peixe que requerem mais estudos para melhorar o seu desempenho, a fim de aumentar sua resistência à tração e diminuir a sua taxa de permeabilidade ao vapor de água. Segundo pesquisas, estes desempenhos podem ser melhorados através da produção de misturas de compostos em que o sistema de hidrocolóides (misturas de proteínas / polissacarídeos) forma uma rede contínua e mais consistente (PORTA *et al.*, 2011; ZAVAREZE, *et al.*, 2012). Essas misturas objetivam melhorar características como a resistência e flexibilidade, adicionar menor quantidade de plastificante e produzir materiais com propriedades únicas que combinam os atributos mais desejáveis de cada componente (WU *et al.*, 2002).

Mistura de polímeros é uma técnica bastante usada sempre que a modificação das propriedades é necessária, porque ele tem fácil e simples procedimento além de baixo custo (WANG *et al.*, 2009). Porta *et al.* (2011) mostraram que os filmes compostos de quitosana e proteínas da farinha de soja ou do soro de leite, apresentaram resultados promissores para melhorar a sua resistência mecânica. Hosseini *et al.* (2012) também utilizou quitosana com o objetivo de melhorar o desempenho físico-químico dos filmes de gelatina de peixe e observaram resultados positivos nos filmes mistos (gelatina de peixe e quitosana), como o aumento da resistência à tração e a redução da permeabilidade ao vapor de água.

As misturas de quitosana com outros polímeros hidrofílicos tem sido sugerida como uma alternativa promissora para a produção de películas feitas sobre medida. Desta forma, especula-se que a combinação de compostos poderia permitir obter melhores filmes do que aqueles formados por cada material individual (BLAIR *et al.*, 1987; QUARASHI *et al.*, 1992; ANDRADY, 1992; YAO *et al.*, 1996; SUTO; UI, 1996; ZAVAREZE, *et al.*, 2012).

### 3.6.2. Mecanismo de formação do biofilme

A formação do biofilme inicia-se com a formação do gel, envolvendo ligações inter e intramoleculares cruzadas entre cadeias de polímeros, formando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente utilizado (KESTER; FENNEMA, 1986).

A formulação desses filmes implica no emprego de ao menos um constituinte capaz de formar uma matriz com a suficiente coesão. Em geral, trata-se de polímeros ou de compostos que nas condições de preparo utilizadas, têm a propriedade de formar estruturas contínuas, cristalinas ou amorfas. O grau de coesão dependerá da estrutura do polímero, do solvente usado, da temperatura, e a presença de outras moléculas como os plastificantes. Esse parâmetro (grau de coesão) influencia nas propriedades de barreira e mecânicas das películas, de forma que uma coesão estrutural elevada se traduz em uma redução da flexibilidade, da porosidade e da permeabilidade aos gases e outros solutos (GONTARD; GUILBERT, 1996; THARANATHAN, 2003).

A transformação da solução filmogênica é resultado de interações intermoleculares, que se traduz em forças estruturais (CARVALHO, 1997). Um processo amplamente utilizado na preparação de filmes biodegradáveis é o método “casting”, onde a solução aquosa é depositada numa superfície apropriada e secada posteriormente: a primeira etapa é solubilização da macromolécula em um solvente (água, etanol, solução de ácido acético e outros), ao qual podem ser incorporados diversos aditivos (plastificante, agentes reticulantes, etc), na segunda etapa, a solução formadora de filme é espalhada sobre um suporte e, usualmente, submetida a secagem (CUQ *et al.*, 1997).

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

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAL**

#### **4.1.1. Matéria-prima**

Foram utilizados subprodutos (aparas da filetagem sem pele) do processamento da dourada (*Brachyplatystoma roussauxii*) adquiridos da indústria de pesca Ecomar localizada no município de Vigia-Pa. As aparas foram embaladas em sacos de polietileno, armazenadas em caixa isotérmica com gelo em escama e transportadas para o Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA) da Universidade Federal do Pará. A quitosana utilizada foi da marca SIGMA-ALDRICH extraída da carcaça do camarão, de peso molecular médio e grau de desacetilação de 75-85%.

### **4.2. MÉTODOS**

#### **4.2.1. Pré tratamento da matéria-prima**

No laboratório as aparas foram higienizadas com imersão em água clorada a 5 ppm (mg/L) por 5 minutos e lavadas com água destilada, em seguida prensada manualmente com o objetivo de retirar o excesso de água. Posteriormente, as aparas higienizadas foram trituradas em processador doméstico (Walita, RI7625), por 60 segundos, e então, acondicionadas em sacos de polietileno embaladas a vácuo e submetidos a congelamento a -26°C até as próximas etapas.

#### **4.2.2. Extração das proteínas miofibrilares**

Para a obtenção das proteínas miofibrilares de peixe, foi utilizada metodologia proposta por Zavareze *et al.* (2012) adaptada, onde as aparas da dourada foram descongeladas sob refrigeração, misturadas com 5 volumes de solução de cloreto de sódio 50 Mm (Synth PA-ACS) a 5°C por 5 minutos seguida de filtração em camada de tecido (faillat), sendo este processo repetido por mais duas vezes. O material retido foi desodorizado com solução de Ácido fosfórico a 0,05% (3:1) por 5 minutos, submetido a filtração e em seguida a lavagem com 3 volumes de água. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 3 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Thermo Fisher, Multifuge X1R). Após as etapas de extração, a pasta com proteínas miofibrilares foi distribuída em bandejas de aço inoxidável, congelada a -22°C e liofilizada a - 60°C por 48 horas (Liotop, L101). As proteínas miofibrilares liofilizadas foram peneiradas (peneira Tyler 35, 0,42 mm), obtendo-se o pó que foi armazenado em temperatura ambiente até ser utilizado na produção do filme biodegradável.

Concluída estas etapas, foi realizado o cálculo do rendimento das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML) através da relação entre a proteína e a quantidade inicial de resíduo utilizado, segundo a Equação 1.

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

#### 4.2.3. Caracterização físico-química e cor instrumental da matéria-prima *in natura* e das proteínas miofibrilares liofilizadas

A composição centesimal e cor instrumental da matéria prima *in natura* e do material proteico liofilizado foi determinada através das análises:

- **Umidade:** foi realizada pelo método gravimétrico de acordo com a metodologia 932.12 da AOAC (1997), por secagem em estufa a 105°C até peso constante;
- **Proteína bruta:** foi determinada através da determinação do nitrogênio total, pelo método de Kjeldahl e conversão em proteína, multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25, de acordo com a metodologia 940.25 da AOAC (1997);
- **Lipídeos:** foi determinado pelo método Soxhlet, usando éter de petróleo como extrator, de acordo com a metodologia 922.06 da AOAC (1997);
- **Cinzas:** foi determinada pelo método gravimétrico, por calcinação em mufla a 550°C; de acordo com a metodologia 938.08 da AOAC (1997);
- **Cor instrumental:** foi determinada utilizando colorímetro MINOLTA modelo CR 310, obtendo-se parâmetros de L\* (luminosidade), a\* (intensidade do vermelho), b\* (intensidade do amarelo), C\* (valor do croma) e h\* (ângulo de tonalidade).

#### 4.2.4. Obtenção do biofilme composto

Os filmes foram obtidos utilizando a metodologia adaptada de Zavareze *et al.* (2012) e Hosseini *et al.* (2012). As soluções filmogênicas foram preparadas com diferentes concentrações de proteína, quitosana e plastificante de acordo com o planejamento fatorial completo (Tabela 1). A produção consistiu primeiramente na solubilização da quitosana e do plastificante em ácido acético a 1% por 30 min em rotação constante, utilizando agitador magnético digital (DiagTeach, modelo ST3120H), depois fez-se a adição da proteína e ajustou-se o pH para 3,0 com Ácido Clorídrico 2 M. A mistura foi homogeneizada a 10.000 rpm durante 5 minutos utilizando homogeneizador Turratec (Tecnal, TE-102) e em seguida colocada em banho-maria (TECNAL, TE-057) durante 30 minutos à 70°C. A solução final foi

filtrada através de camada de tecido (failet) para remover os materiais não solubilizados, obtendo-se a solução filmogênica.

Em seguida, através do método *casting*, 120mL da solução filmogênica foi colocada em suporte de silicone de 22cm de diâmetro por 3cm de altura, e secas em estufa incubadora (Quimis, Q315M) a 30 °C durante 16hs. Após a secagem, os biofilmes foram acondicionados em sacos de polietileno à temperatura ambiente, até serem analisados.

#### 4.2.5. Delineamento Composto Central Rotacional

Para estabelecer a melhor combinação de proteína, quitosana e plastificante no processo de obtenção do biofilme, foi utilizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  onde foram realizados 17 experimentos (Tabela 2), sendo 8 ensaios fatoriais (combinação entre os níveis  $\pm 1$ ), 3 ensaios no ponto central (três variáveis no nível 0) e 6 ensaios nos níveis axiais  $\pm \alpha$ . Tendo como variáveis de entrada (independentes): a concentração de proteínas miofibrilares liofilizada, a concentração de quitosana e a concentração de plastificante. As variáveis dependentes estudadas foram: permeabilidade ao vapor de água, resistência a tração e porcentagem de alongação. Os resultados esperados são: baixos valores de permeabilidade ao vapor de água e altos valores de resistência a tração e de alongação. A Tabela 1 apresenta os níveis das variáveis que foram estudadas no processo de obtenção do filme composto, definidas de acordo com testes preliminares realizados.

**Tabela 1-** Definição dos níveis das variáveis estudadas na obtenção do biofilme composto.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	$-\alpha$ (1,68)	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$ (1,68)
PROTEÍNA MIOFIBRILAR LIOFILIZADA – PML <sup>1</sup>	0,45	0,8	1,3	1,8	2,14
QUITOSANA – Q <sup>2</sup>	13,18	20	30	40	46,81
PLASTIFICANTE – P <sup>3</sup>	23,18	30	40	50	56,81

1- Porcentagem calculada em relação ao volume total de solução; 2- Porcentagem calculada em relação a proteína (PML); 3- Porcentagem calculada em relação a soma do peso de proteína e quitosana.

**Tabela 2-** Planejamento fatorial completo composto central rotacional ( $2^3$ ) com valores codificados e reais.

Ensaio	<i>Codificado</i>			<i>Real</i>		
	PML* (%)	Q* (%)	P* (%)	PML (%)	Q (%)	P (%)
1	-1	-1	-1	0,8	20	30
2	-1	-1	1	0,8	20	50
3	-1	1	-1	0,8	40	30
4	-1	1	1	0,8	40	50
5	1	-1	-1	1,8	20	30
6	1	-1	1	1,8	20	50
7	1	1	-1	1,8	40	30
8	1	1	1	1,8	40	50
9	-1,68	0	0	0,45	30	40
10	1,68	0	0	2,14	30	40
11	0	-1,68	0	1,3	13,18	40
12	0	1,68	0	1,3	46,81	40
13	0	0	-1,68	1,3	30	23,18
14	0	0	1,68	1,3	30	56,81
15	0	0	0	1,3	30	40
16	0	0	0	1,3	30	40
17	0	0	0	1,3	30	40

\* PML= Concentração de proteínas; \*Q = Concentração de quitosana; P\*= Concentração de plastificante

Para a análise dos resultados experimentais, foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta, onde verificou-se o comportamento das combinações das variáveis independentes e as respostas das variáveis dependentes. Foi realizada a exclusão dos efeitos não significativos para obtenção das equações e gráficos que demonstram a influência dos fatores (Proteína/ Quitosana/ Plastificante) sobre as variações de PVA, resistência a tração (RT) e alongação (E). Com os resultados, foram definidas as melhores concentrações das variáveis independentes para o processo de obtenção do biofilme composto.

#### 4.2.6. Caracterização reológica da solução filmogênica

Foram determinadas as propriedades reológicas da solução filmogênica com 1,3% de proteínas miofibrilares, 40% de plastificante e a solução do filme otimizado (proteína, quitosana e plastificante), para estabelecer a influencia da adição de quitosana nas propriedades reológicas da solução. As determinações das características reológicas foram realizadas segundo metodologia descrita por Bof *et al.* (2015), utilizando viscosímetro (Haake, VT 550, Alemanha) acoplado ao sistema de configuração de cilindros coaxiais copo SV e cilindros SV1. A viscosidade aparente da solução filmogênica foi determinada a 28 °C, com taxa de cisalhamento variando entre 0 e 500 s<sup>-1</sup> e as curvas foram satisfatoriamente modeladas matematicamente como fluido de Ostwald de Waele pela equação:

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:  $\tau$  = tensão de corte; K= coeficiente de consistência;  $\gamma$  = velocidade de cisalhamento; n= índice de comportamento do fluxo.

#### 4.2.7. Caracterização do biofilme composto

Foi realizado a caracterização do biofilme composto otimizado e do biofilme controle a 1,3 % de PML e 40% de plastificante.

##### 4.2.7.1. Espessura

A espessura dos biofilmes foram medidas utilizando um micrômetro digital com resolução de 0,001 mm (Insize, modelo IP54). Foram selecionados oito locais aleatórios em torno de cada biofilme obedecendo a um afastamento da borda de 60 mm para a determinação da espessura (ZAVAREZE *et al.* 2012).

##### 4.2.7.2. Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e porcentagem de alongamento na ruptura (E) dos biofilmes foram determinadas empregando-se metodologia ASTM D882-91 (ASTM, 1996) utilizando texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA. XT- plus).

As medidas foram conduzidas em temperatura ambiente (23°C). A separação inicial das garras e a velocidade foram de 50 mm e 1 mm.s<sup>-1</sup>, respectivamente de acordo com metodologia descrita por Zavareze *et al.* (2012). As amostras foram cortadas em tiras de 100

mm de comprimento e 25 mm de largura. A resistência à tração (RT) e a porcentagem de alongação (E) foram calculadas pelas Equações 3 e 4.

$$RT = \frac{Fm}{A} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: RT: resistência à tração (MPa); Fm: força máxima no momento da ruptura do filme (N); A: área da secção transversal do filme (m<sup>2</sup>).

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

Onde: E: alongação (%); d<sub>T</sub>: distância total no momento da ruptura (mm); d<sub>inicial</sub>: distância inicial de separação das garras (50 mm).

#### 4.2.7.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

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

As amostras dos biofilmes foram seladas com adesivo de silicone na abertura circular de um recipiente de vidro de 4,5 cm de diâmetro e 7,0 cm de altura contendo 10 g de sílica gel a 0% UR; 0 Pa de pressão de vapor de água a 30°C. Estes recipientes de permeação foram colocados em dessecadores contendo água destilada a 30°C a 99% UR; 4244,9 Pa de pressão de vapor de água a 30°C. Foram pesados em intervalos de 1h por um período de 10 horas. A PVA foi calculada através da Equação 5.

$$PVA = \frac{W \cdot X}{A \cdot t \cdot \Delta P} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: PVA: permeabilidade ao vapor de água (g.m. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>); W: ganho de peso pelo dessecante (g); X: espessura do filme (mm); A: área da superfície do biofilme exposto (m<sup>2</sup>); t: tempo de incubação (horas); ΔP: diferença de pressão parcial (Pa). Três corpos de provas serão usados para testes de PVA.

#### 4.2.7.4. Solubilidade e intumescimento

Para determinação da solubilidade, foi estabelecida a matéria seca inicial em estufa a 105 °C/24h em filmes recortados com 2 cm de diâmetro. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipientes contendo 50 mL de água. O sistema foi agitado em incubadora Shaker refrigerada (Cielanb, modelo CE-725B) com velocidade de 150 rpm por

24 horas a 25°C. Após este período, as amostras foram removidas e secas (105°C por 24 horas), para determinar a matéria seca não dissolvida em água (GONTARD *et al.*, 1994).

A determinação do intumescimento do biofilme utilizou metodologia de Lee *et al.* (2004), onde uma amostra de 2cm de diâmetro foi pesada e imersa em 75 mL de água destilada, e em seguida colocada em estufa incubadora (Quimis, Q315M) a 25 °C por 6 h. Após este procedimento, o excesso de água dos filmes foi removida com papel filtro, o filme foi pesado novamente para calcular a quantidade de água que foi absorvida durante as 6 h de análise. Desta forma, o intumescimento foi determinado como o ganho de peso da amostra inchada dividido pelo peso inicial de sólidos secos.

#### 4.2.7.5. Transmissão de luz e transparência

A transmitância de luz dos biofilmes foi medida na faixa do ultravioleta e do visível (200 e 800 nm). Os corpos de prova foram cortados em retângulos (3 x 1 cm) e colocados no lado interno da cubeta. A transparência dos biofilmes foi determinada em triplicata e os dois parâmetros foram quantificados usando um espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22). A transparência foi determinada a 600 nm por meio da Equação 6, de acordo com o método ASTM D1746 descrito por Arfat *et al.* (2014).

$$Transparência = \frac{-\log \%T}{e} \quad \text{Equação (6)}$$

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

#### 4.2.7.6. Cor

A cor dos biofilmes foi determinada utilizando colorímetro MINOLTA modelo CR 310, obtendo-se parâmetros de L\* (luminosidade), a\* (intensidade do vermelho), b\* (intensidade do amarelo), C\* (valor do croma), h\* (ângulo de tonalidade) e a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) calculado de acordo com a equação 7.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação (7)}$$

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

#### 4.2.7.7. Análises térmicas

##### Termogravimetria (TG) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Termogavimetria (TGA-50 Shimadzu) dos biofilmes foi determinada de acordo com Nuthong *et al.* (2009). Para realizar a análise foi utilizado 2,178 mg de massa de biofilme, temperatura de 25 a 600 °C, taxa de aquecimento de 10°C/minuto e o nitrogênio a 50 ml/minuto como gás de arraste.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC-60 plus Shimadzu) dos biofilmes foi determinada de acordo com Nuthong *et al.* (2009). O ensaio utilizou massa de biofilme de 1,300 mg, temperatura de 25 a 300°C, taxa de aquecimento de 10°C/ minuto e o gás de arraste foi o nitrogênio a 50ml/minuto.

#### **4.2.7.8. Caracterização microscópica da superfície e secção transversal do biofilme**

A microestrutura da superfície superior e da secção transversal do biofilme foi determinada utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Leo-Zeiss, modelo 1430).

### **4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do programa Statistica® versão 7.0 (STATSOFT Inc., 2004) através da avaliação dos efeitos, análise de variância e análise de superfície de reposta para delineamento composto central rotacional.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES LIOFILIZADA

#### 5.1.1. Caracterização físico-química e cor instrumental da matéria-prima e das proteínas miofibrilares liofilizadas.

Os resultados da caracterização físico-química e parâmetros de cor instrumental da matéria-prima e das proteínas miofibrilares liofilizadas estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Caracterização físico-química e cor instrumental da matéria-prima e das proteínas miofibrilares liofilizadas.

Determinações	MP <sup>1</sup>	PML <sup>2</sup>
<b>Proteínas</b>	80,02 ± 0,34	94,92 ± 0,42
<b>Cinzas</b>	0,46 ± 0,20	1,10 ± 0,05
<b>Lipídeos</b>	16,91 ± 0,71	3,30 ± 0,18
<b>Umidade</b>	3,71 ± 0,09	0,05 ± 0,09
<b>Rendimento</b>	–	14,10%
<b>Parâmetros de cor</b>		
<b>L*</b>	77,89 ± 0,76	87,10 ± 0,005
<b>a*</b>	-38 ± 0,01	-3,52 ± 0,02
<b>b*</b>	17,41 ± 0,39	17,54 ± 0,05
<b>h*</b>	91,25 ± 0,02	101,36 ± 0,06
<b>C*</b>	17,42 ± 0,39	17,89 ± 0,005

<sup>1,2</sup> Representam a média das triplicatas ± desvio-padrão da matéria-prima (MP) em base seca e Proteínas Miofibrilares Liofiliza (PML) em base seca; L\* = Luminosidade; a\* = verde-vermelho; b\* = azul-amarelo; c\* = croma; h\* = ângulo de tonalidade.

Houve diminuição da umidade da matéria-prima (MP) ao comparar com as proteínas miofibrilares liofilizada (PML), o que já era esperado, devido ao processo de desidratação aplicado. O teor de lipídeos também diminuiu entre MP e PML, devido ao processo de extração, onde considerável quantidade de gordura é eliminada, especialmente na etapa de centrifugação. Já as concentrações de proteínas e cinzas aumentaram, devido a extração e a remoção de água do material proteico.

O teor de proteínas (Tabela 3) encontra-se próximo ao estabelecido pela Tabela de Composição de Alimentos (TACO, 2011) de 78,99% e aos obtidos por Bentes *et al.* (2009) para dourada de 85,845%. Este resultado é relevante, visto que uma elevada concentração de proteínas é importante para a formação de solução filmogênica a base de biopolímeros. Os resultados de lipídeos também se aproximaram aos obtidos por Bentes *et al.* (2009) de 2,7% , observando-se apenas pequena diferença, que pode ser justificada, pois segundo Larsen *et al.* (2011), o teor de lipídeos pode sofrer grandes variações de 0,2 a 25%, devido às modificações

na composição química ocasionadas até mesmo dentro da mesma espécie, por fatores como idade, sexo, alimentação e o local de pesca.

Em geral, a cor não influencia nas propriedades funcionais das proteínas, porém, pode ter influências na coloração do biofilme, tornando-a um parâmetro importante, uma vez que o aspecto visual é decisivo na aceitação do produto (LIMA *et al.*, 2007).

A Luminosidade ( $L^*$ ) varia de 0 para o preto, até 100 para o branco,  $a^*$  positivo é uma medida do vermelho e o  $a^*$  negativo do verde, o  $b^*$  positivo é uma medida do amarelo e o  $b^*$  negativo do azul (MARQUES, 2008). Os valores para luminosidade ( $L^*$ ) deste trabalho apresentaram-se maiores para a PML (87,10) quando comparados com os resultados obtidos para a matéria-prima (77,89), indicando que o processo de extração acarretou no clareamento e conseqüentemente melhoramento da cor, uma vez que acarretou na eliminação de sangue e outros pigmentos. Os valores  $a^*$  e  $b^*$  foram baixos (Tabela 3), demonstrando pouca influência desses parâmetros na formação da cor da proteína estudada.

O valor de croma ( $*C$ ) é o atributo que indica a pureza da cor, ou seja, o quanto esta difere do cinza, onde valores próximos de zero significam coloração cinzenta (TUNICK, 2000). Neste trabalho obteve-se 17,42 e 17,89 para a matéria prima e proteínas miofibrilares liofilizada, respectivamente, indicando que ambas possuem pouca tendência ao cinza. O ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) define tonalidade em si, e, no caso de ser negativo, apresenta uma tendência a coloração escura (CHEOW *et al.*, 2007; HUNTERLAB INC., 2008, 2012). Neste trabalho os valores de  $h^*$  para matéria prima foram 91,25 e para PML 101,36 indicando coloração clara. A combinação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , foi correspondente a cor perceptível para matéria prima e para a PML, com aparência clara, esbranquiçada e com pouca tendência ao cinza.

O rendimento é influenciado diretamente pelo processo de extração, onde são retiradas, por exemplo, as proteínas solúveis como as sarcoplasmáticas e os lipídeos, nesse trabalho, o rendimento após a extração das proteínas miofibrilares foi de 14,10%.

## 5.2. DEFINIÇÕES DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DO BIOFILME COMPOSTO

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das repostas permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência a tração (RT) e alongação (E), obtidas experimentalmente no processo de obtenção de biofilme composto de proteínas miofibrilares de peixe com adição de quitosana.

**Tabela 4** – Resultados experimentais para otimização do biofilme composto

<b>Ensaio</b>	<b>Valores reais</b>			<b>Variáveis Dependentes</b>		
	<b>PML</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>PVA*</b>	<b>RT*</b>	<b>E*</b>
<b>01</b>	0,8	20	30	1,366	5,690	272,422
<b>02</b>	0,8	20	50	1,181	3,350	293,753
<b>03</b>	0,8	40	30	0,998	7,517	269,688
<b>04</b>	0,8	40	50	1,036	3,626	311,122
<b>05</b>	1,8	20	30	2,195	7,478	316,364
<b>06</b>	1,8	20	50	2,907	5,371	358,889
<b>07</b>	1,8	40	30	2,532	8,811	298,493
<b>08</b>	1,8	40	50	3,991	6,158	352,674
<b>09</b>	0,45	30	40	0,782	3,562	265,225
<b>10</b>	2,14	30	40	4,844	6,254	342,653
<b>11</b>	1,3	13,18	40	1,664	6,244	325,274
<b>12</b>	1,3	46,81	40	2,394	7,291	318,607
<b>13</b>	1,3	30	23,18	1,611	8,621	263,276
<b>14</b>	1,3	30	56,81	1,877	4,905	337,931
<b>15</b>	1,3	30	40	1,714	6,575	322,280
<b>16</b>	1,3	30	40	1,738	6,068	320,422
<b>17</b>	1,3	30	40	1,923	6,056	319,782

PML: Concentração de proteínas miofibrilares (%); Q: Concentração de Quitosana (%); P: Concentração de plastificante; PVA: Permeabilidade ao vapor de água ( $\text{g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ); RT: Resistencia a tração (MPa); E: Elongação (%).

### 5.2.1. ESTIMATIVA DOS EFEITOS

Os resultados da análise estatística aplicados aos experimentos de cada resposta avaliada foram determinados através do erro puro e SS residual, e são apresentados na Tabela 5. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e de interação destacados em negrito indicam que a variável apresentou efeito significativo (pelo erro puro e SS residual  $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 5** – Estimativa dos efeitos das variáveis associada a significância para cada resposta estudada.

Variáveis independentes	PVA		RT		E	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
<b>Constante</b>	<b>1,8041</b>	<b>0,0013</b>	<b>6,2421</b>	<b>0,0007</b>	<b>320,7585</b>	<b>0,000005</b>
PML (L)	<b>2,0320</b>	<b>0,0009</b>	<b>1,7811</b>	<b>0,0080</b>	<b>45,3477</b>	<b>0,0002</b>
PML (Q)	<b>0,6360</b>	<b>0,0112</b>	<b>-0,9996</b>	<b>0,0297</b>	<b>-11,4647</b>	<b>0,0045</b>
Q (L)	0,3127	0,1041	<b>0,8763</b>	<b>0,0318</b>	<b>-3,0261</b>	<b>0,0498</b>
Q (Q)	0,0816	0,3534	0,3155	0,2157	1,2646	0,2434
P (L)	0,3619	0,0675	<b>-2,5246</b>	<b>0,0040</b>	<b>41,7412</b>	<b>0,0002</b>
P (Q)	-0,1198	0,2205	0,3123	0,2188	<b>-13,8234</b>	<b>0,0031</b>
PML x Q	0,4835	0,0629	0,0042	0,9855	<b>-9,6803</b>	<b>0,0088</b>
PML x P	<b>0,5795</b>	<b>0,0189</b>	0,3681	0,2210	<b>8,4858</b>	<b>0,0114</b>
Q x P	0,2425	0,0955	-0,5240	0,1295	<b>7,9399</b>	<b>0,0130</b>

PML= Proteínas miofibrilares liofilizada; Q= Quitosana; P= Plastificante; (L)= linear; (Q)= quadrático; PVA: Permeabilidade ao vapor de água; RT: Resistencia a tração; E: Elongação.

O efeito estimado indica o quanto cada fator influi nas respostas estudadas e quanto maior for o seu valor, maior será sua influência. Com exceção do efeito das interações onde é necessário fazer uma análise conjunta dos parâmetros que estão interagindo, quando o efeito é positivo indica que ao passar de um valor mínimo a um máximo da variável, a resposta aumenta. Um efeito negativo indica o contrário, ou seja, ao passar de um valor mínimo para o valor máximo, a resposta diminui. Para o valor do coeficiente p, normalmente é escolhido como intervalo de confiança, o valor de 95%. Sendo assim, pode-se afirmar que, para valores de p inferiores 0,05, a variável é considerada estatisticamente significativa (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Com relação a permeabilidade ao vapor de água (PVA), observa-se na Tabela 5 que os efeitos significativos foram proteínas miofibrilares (PML) linear, quadrática, e a interação proteínas miofibrilares e plastificante (PML x P), com efeito positivo, ou seja, um aumento em qualquer um dos efeitos principais acarreta em um aumento no PVA. Analisando a interação, um aumento na concentração de proteínas miofibrilares associada a uma diminuição da concentração de plastificante também acarreta em aumento do PVA. Verifica-se também que a concentração de proteína linear apresenta maior efeito sobre a

permeabilidade ao vapor de água, seguida pela concentração de proteína quadrática e a interação proteína e plastificante.

De acordo com Di Pierro *et al.* (2006), quantidades crescentes de proteína aumenta a permeabilidade ao vapor de água dos filmes, estando diretamente relacionada com o número de grupos polares (grupos laterais dos aminoácidos polares) disponíveis nas cadeias proteicas (-OH, -COOH e -NH<sub>2</sub>). Esse mesmo comportamento foi observado por Zavareze *et al.* (2012), ao trabalhar com filmes de proteínas miofibrilares de peixe e verificaram proporcionalidade nesses parâmetros, onde o aumento da concentração de proteínas proporcionou acréscimo de PVA.

Segundo Box; Wetz (1973) para uma regressão ser significativa não apenas estatisticamente, mas também ser útil para fins preditivos, o valor de F para regressão deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes maior que o valor de F tabelado. Analisando os dados de PVA na Tabela 6, observa-se que o modelo se adequou a esse critério, pois o F calculado foi 69,09 vezes maior que o F tabelado e a falta de ajuste não foi significativa no mesmo nível de confiança. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi de 0,95, indicando que o modelo explicou 95% da variação dos dados observados.

**Tabela 6-** Modelo reduzido para permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência a tração (RT) e alongação (E) em função das variáveis independentes, teste F e R<sup>2</sup>.

Respostas	Modelo	F- valor		R <sup>2</sup>
		Regressão	F.A	
PVA	$1,804 + 1,016 (PML) + 0,318 (PML)^2 + 0,2897 (PML \times P)$	1328,094	8,076	0,95
RT	$6,242 + 0,890 (PML) - 0,499 (PML)^2 + 0,438 (Q) - 1,262 (P)$	449,436	2,177	0,94
E	$320,758 + 22,673 (PML) - 5,732 (PML)^2 - 1,513 (Q) + 20,870 (P) - 6,91 (P)^2 - 4,840 (PML \times Q) + 4,242 (PML \times P) + 3,969 (Q \times P)$	8619,739	3,695	0,99

Regressão: F<sub>TAB</sub> = 19,22 (PVA); F<sub>TAB</sub> = 19,25 (RT); F<sub>TAB</sub> = 19,37 (E)

Falta de ajuste: F<sub>TAB</sub> = 19,37 (PVA); F<sub>TAB</sub> = 19,39 (RT); F<sub>TAB</sub> = 19,32 (E)

Com relação a resistência a tração (RT), observa-se na Tabela 5 que os efeitos significativos foram proteína miofibrilar (PML) linear e quadrático, quitosana (Q) linear e plastificante (P) linear. Analisando esses resultados, verifica-se que a concentração de plastificante linear, apresenta maior efeito sobre essa resposta tendo efeito negativo, ou seja,

ao passar do nível -1 para +1 há uma diminuição na resistência a tração, tornando o biofilme menos resistente. Esse comportamento justifica-se pelo fato da presença do plastificante diminuir a densidade das interações polímero-polímero, aumentando a mobilidade das cadeias e tornando os filmes menos resistentes e mais deformáveis (CUQ *et al.*, 1997).

Avaliando os dados de RT na Tabela 6, verifica-se que o modelo apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança. A razão entre  $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$  da regressão é 23,34, satisfazendo o critério de Box Wetz (1973), portanto, o modelo também é útil para fins preditivos. O valor de  $R^2$  para RT foi de 0,94, indicando que o modelo descreveu adequadamente o comportamento do processo, explicando mais de 94% da variação dos dados experimentais.

Para Elongação (E), a Tabela 5 mostra que todos os efeitos foram significativos com exceção da quitosana quadrática. A concentração de proteína (PML) linear e a concentração de plastificante (P) linear, apresentaram maiores efeitos sobre alongação, tendo efeito positivo, o que indica que ambos ao passarem do -1 para +1 causam um aumento na alongação, tornando o filme mais elástico. Analisando a interação proteína e quitosana (PML x Q), observa-se que um aumento na concentração de proteína associada a uma diminuição da concentração de quitosana acarreta em maiores valores de alongação. O mesmo comportamento é observado na interação proteína e plastificante (PML x P), ou seja, quanto a proteína encontra-se no maior nível e o plastificante no menor, observa-se elevação na alongação. Na interação quitosana e plastificante (Q x P), obtêm-se maiores resultados de alongação quando a quitosana encontra-se no menor nível e o plastificante no maior.

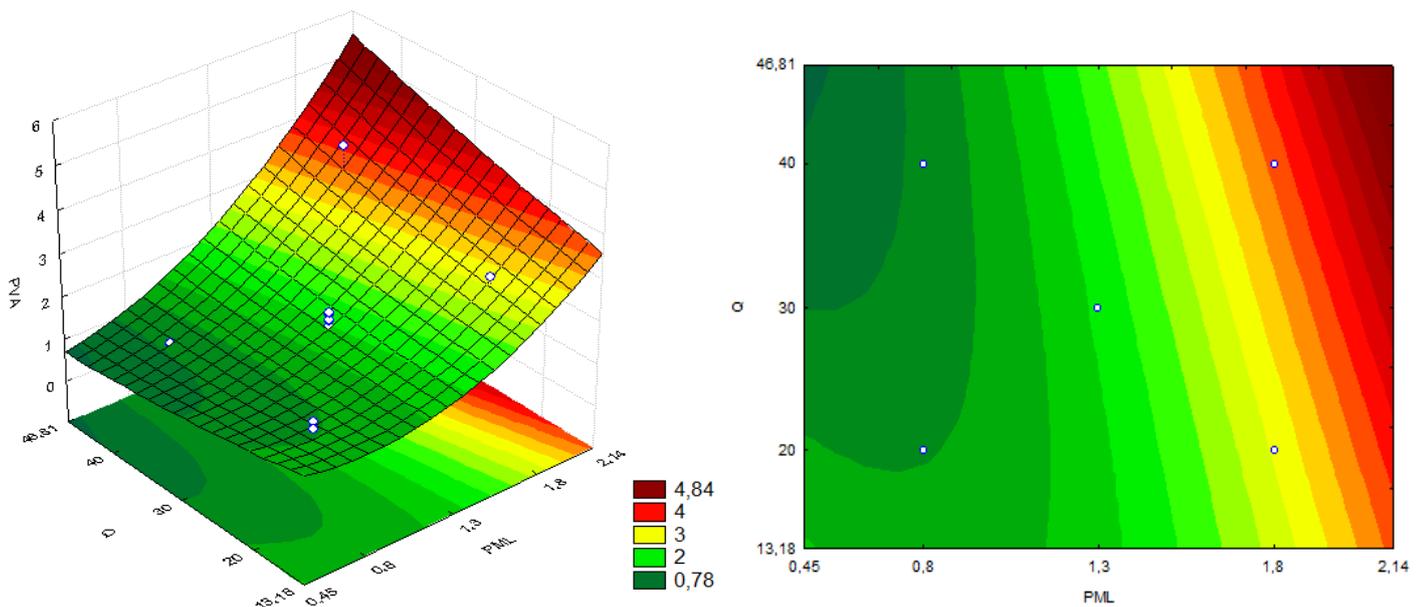
A concentração de plastificante tem influência direta na alongação devido à capacidade do glicerol em reduzir as interações entre as cadeias dos polímeros, diminuindo assim a resistência do biofilme e aumentando sua flexibilidade (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000).

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi 0,99, indicando que o modelo explicou 99% da variação dos dados observados. O modelo apresentou regressão significativa com 95% de confiança ( $F$  calculado superior ao  $F$  tabelado) e falta de ajuste não significativo no mesmo nível de confiança ( $F$  calculado inferior ao  $F$  tabelado). Sendo assim o modelo ajustado para resposta alongação foi considerado preditivo.

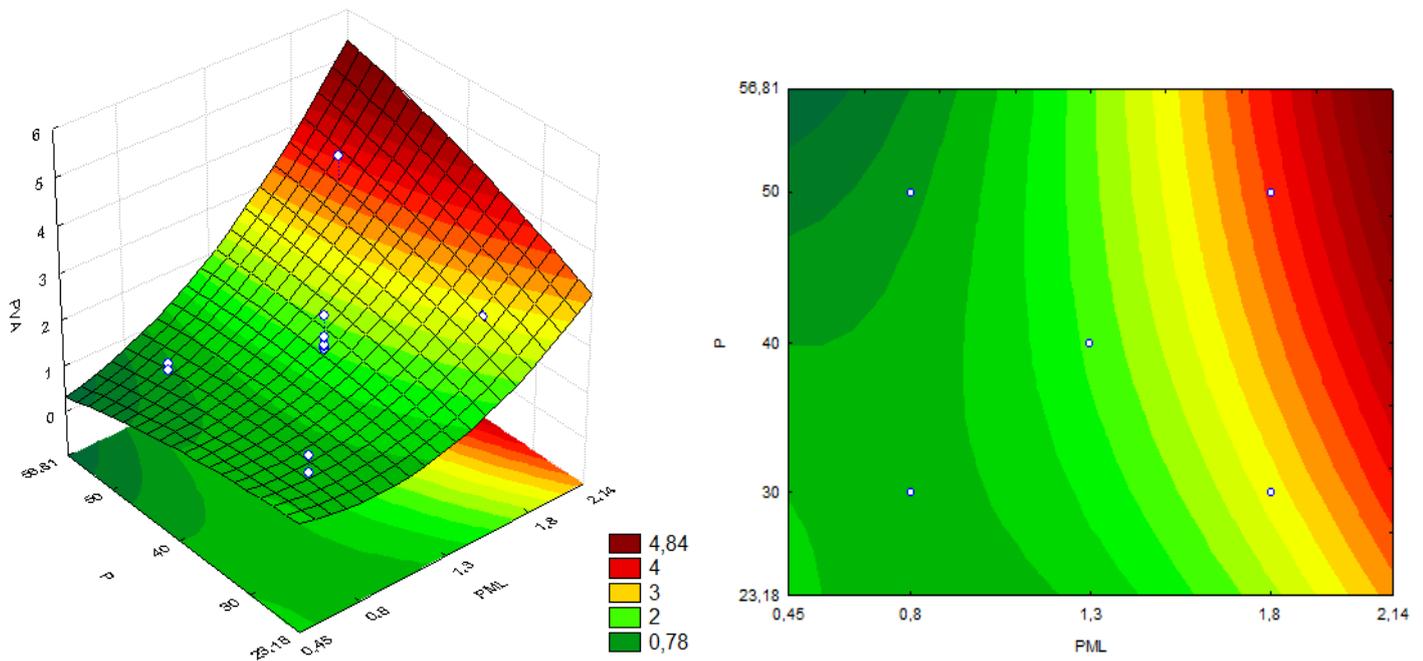
### 5.3. GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

#### 5.3.1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

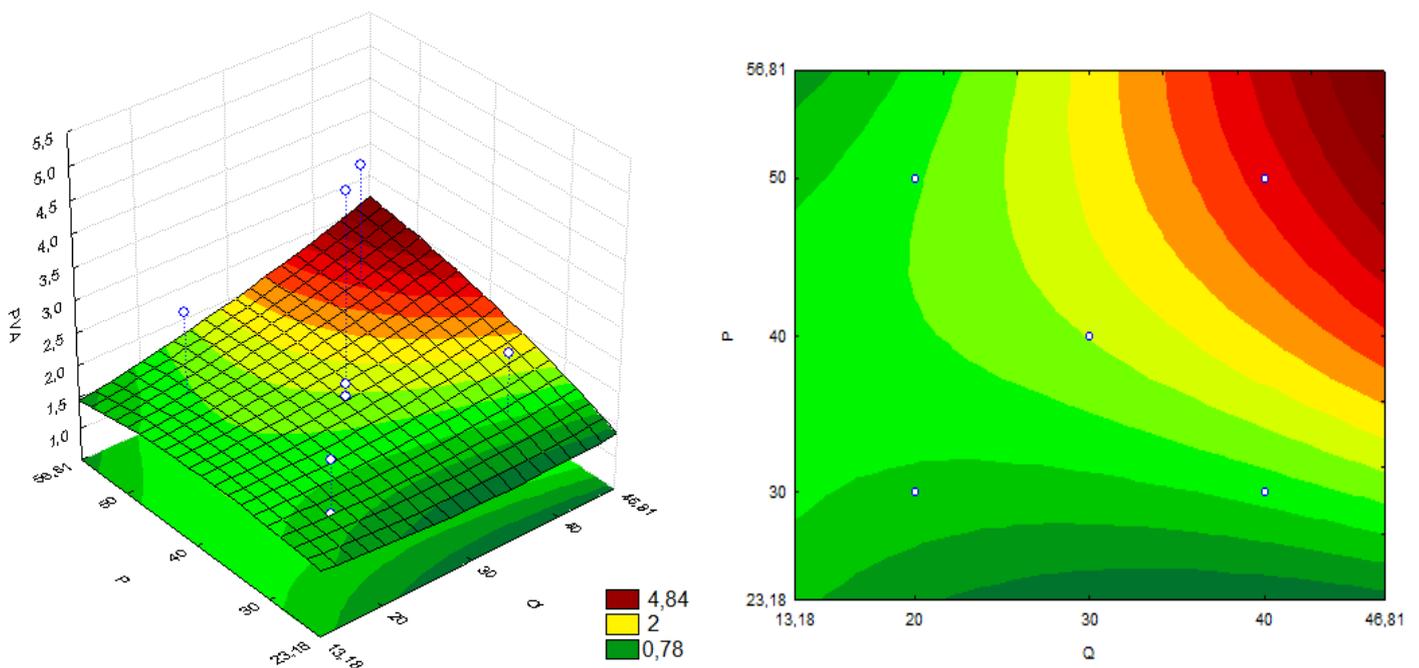
Nas Figuras 3a, 3b e 3c são mostradas as superfícies de resposta e curvas de níveis geradas através do modelo proposto, considerando-se os pontos médios da concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML), quitosana (Q) e plastificante (P). Estas superfícies confirmam a análise dos efeitos realizados anteriormente e permitem visualizar a variação da resposta.



**Figura 3a-** Superfície de resposta e curvas de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e concentração de quitosana (Q %) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 3b-** Superfície de resposta e curvas de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 3c-** Superfície de resposta e curvas de nível para permeabilidade ao vapor de água (PVA), relacionando concentração de quitosana (Q %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.

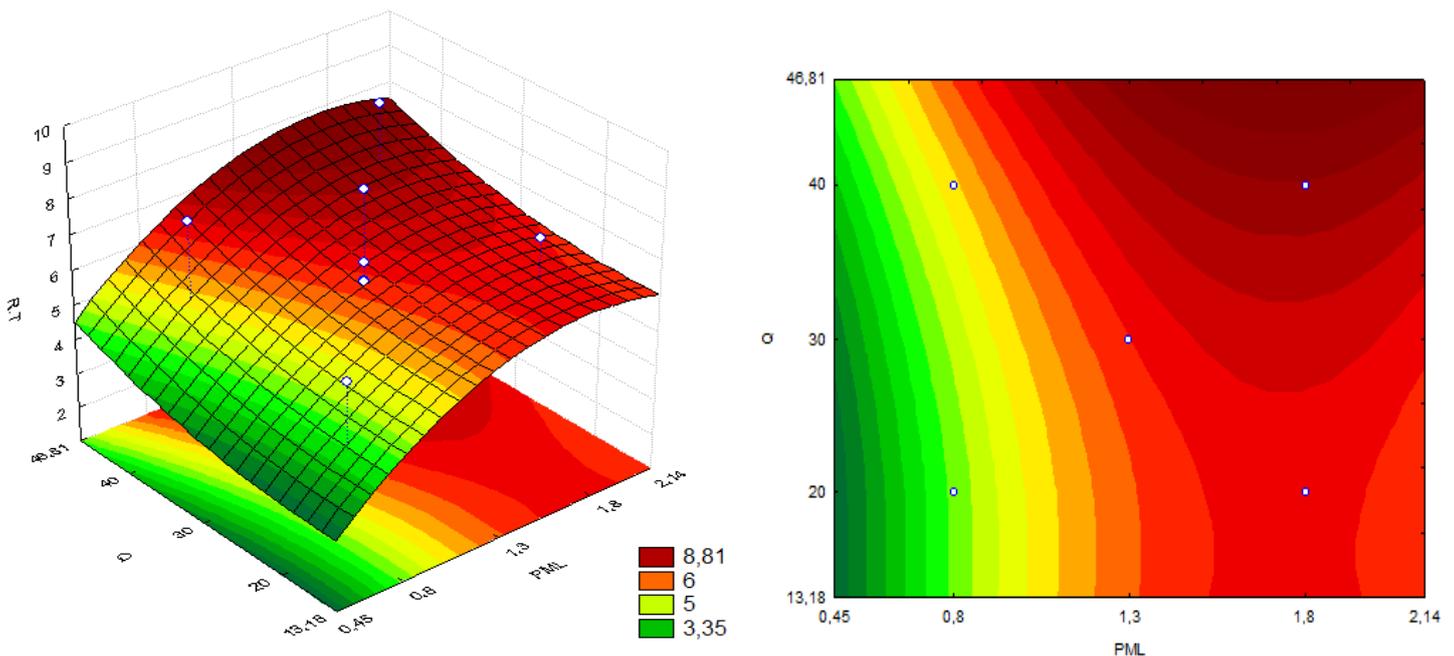
Na Figura 3a- é possível observar um aumento da permeabilidade ao vapor de água com a elevação da concentração de proteína miofibrilar liofilizada, o mesmo comportamento

também é apresentado na Figura 3b- podendo ser visualizado nas curvas de nível, confirmando o efeito positivo para esse fator.

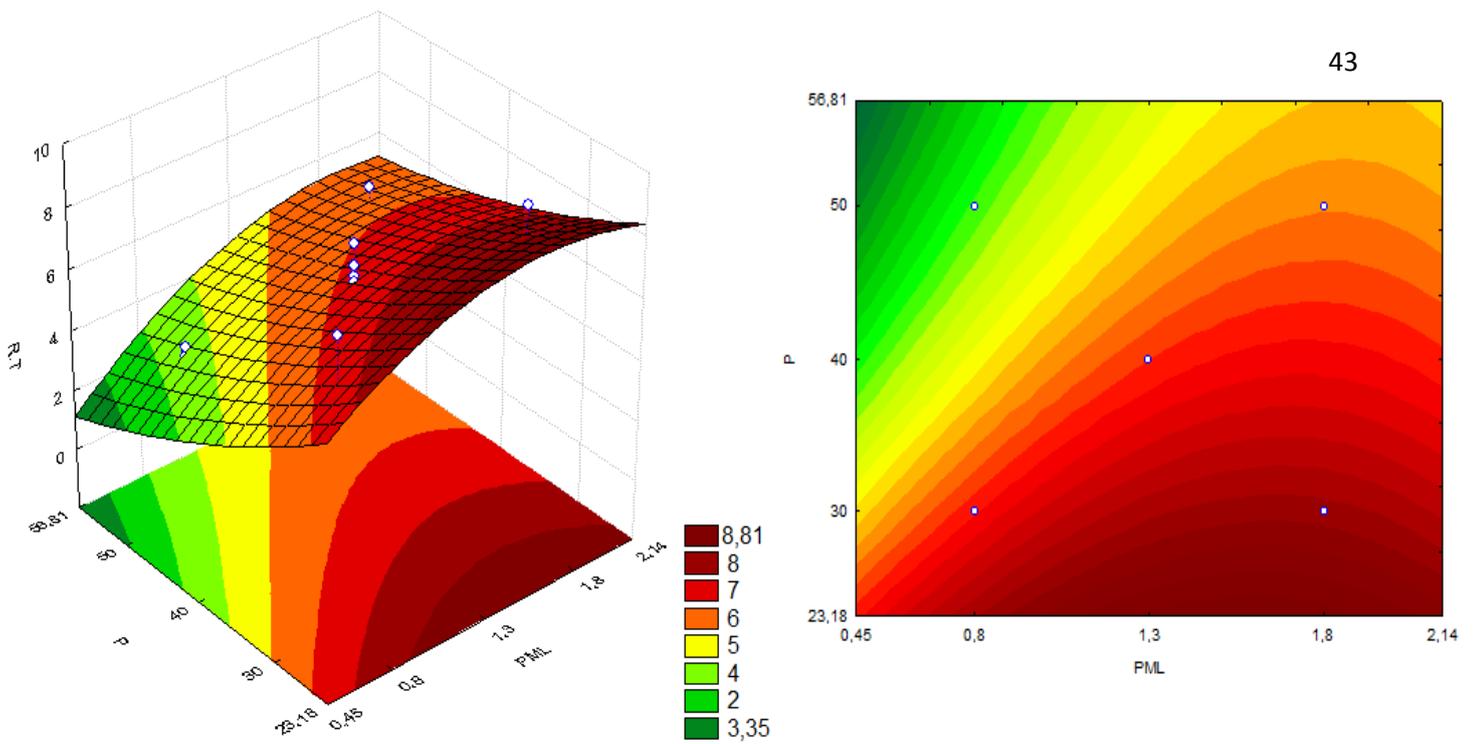
Dentro do que foi obtido nesse experimento e levando em consideração que para a resposta PVA o que se espera são menores resultados, as melhores regiões para essa resposta foram: 0,45 a 1,3% para proteínas miofibrilares liofilizada; 13,18 a 46,81% para quitosana e 23,18 a 56,81% para o plastificante combinados de forma adequada, o que implica dizer, que os ensaios dentro dessa faixa apresentam os melhores valores de PVA. É possível observar na Tabela 4 que o melhor valor encontrado neste trabalho foi  $0,782 \times 10^{-10} \text{ g.m. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ .

### 5.3.2. Resistencia a tração (RT)

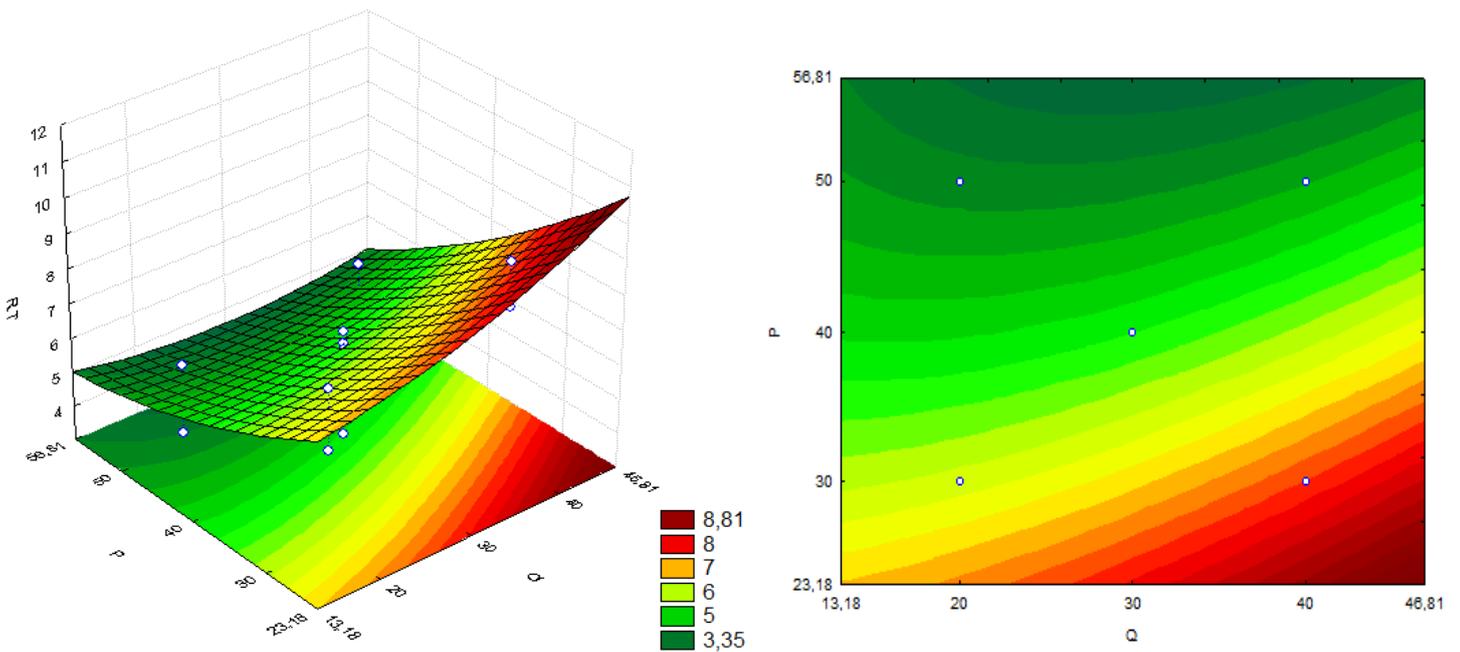
As Figuras 4a, 4b e 4c mostram as superfícies de resposta e curvas de nível geradas, através do modelo proposto, considerando-se pontos médios das concentrações de proteína miofibrilar liofilizada (PML), quitosana (Q) e plastificante (P).



**Figura 4a-** Superfície de resposta e curvas de nível para resistencia a tração (RT), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e quitosana (Q %) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 4b-** Superfície de resposta e curvas de nível para resistência a tração (RT), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 4c-** Superfície de resposta e curvas de nível para resistência a tração (RT), relacionando concentração de quitosana (Q %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto

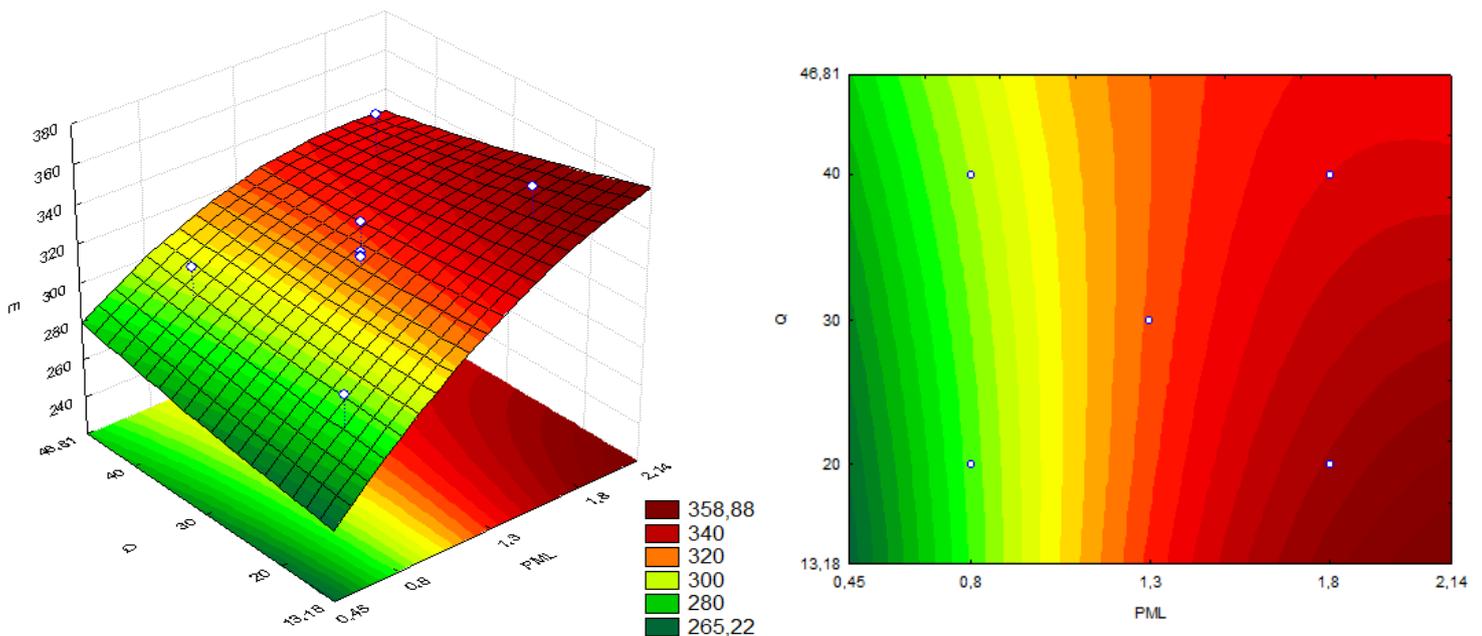
Através das Figuras 4a e 4c, que representa as curvas e superfícies de resposta do modelo, observa-se um aumento na resistência a tração com o aumento da concentração de proteínas miofibrilares liofilizada e quitosana, ambas apresentando efeito positivo sobre essa resposta. Comportamento contrário pode ser observado em relação a

concentração de plastificante (Figura 4b), que apresenta efeito negativo, diminuindo o valor da resistência a tração com o aumento da sua concentração.

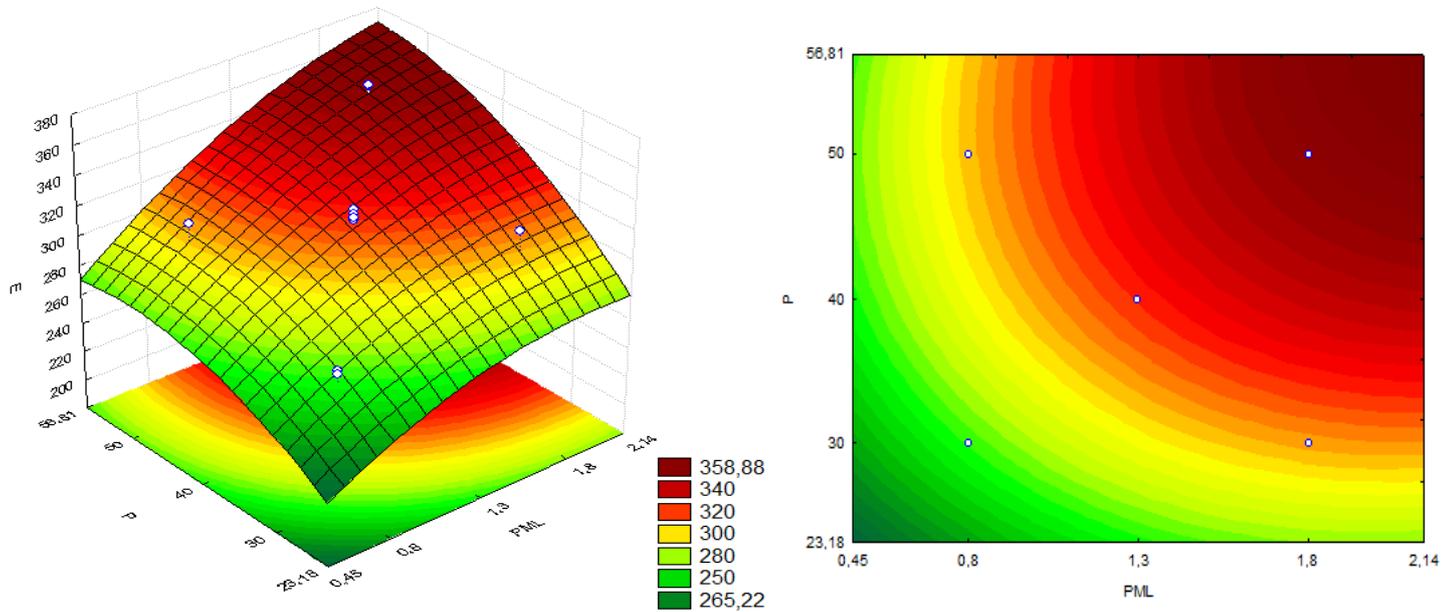
Pode-se observar nas Figuras 4a, 4b e 4c, que os melhores resultados para resistência a tração, levando em consideração que para essa resposta espera-se resultados maiores, encontraram-se dentro das seguintes faixas: 1,3 a 2,14% de proteínas miofibrilares liofilizada, 13,18 a 46,81 de quitosana e 23,18 a 50% de plastificante. O melhor valor encontrado para resistência a tração nesse trabalho foi de 8,811 MPa (Tabela 4).

### 5.3.3. Elongação (E)

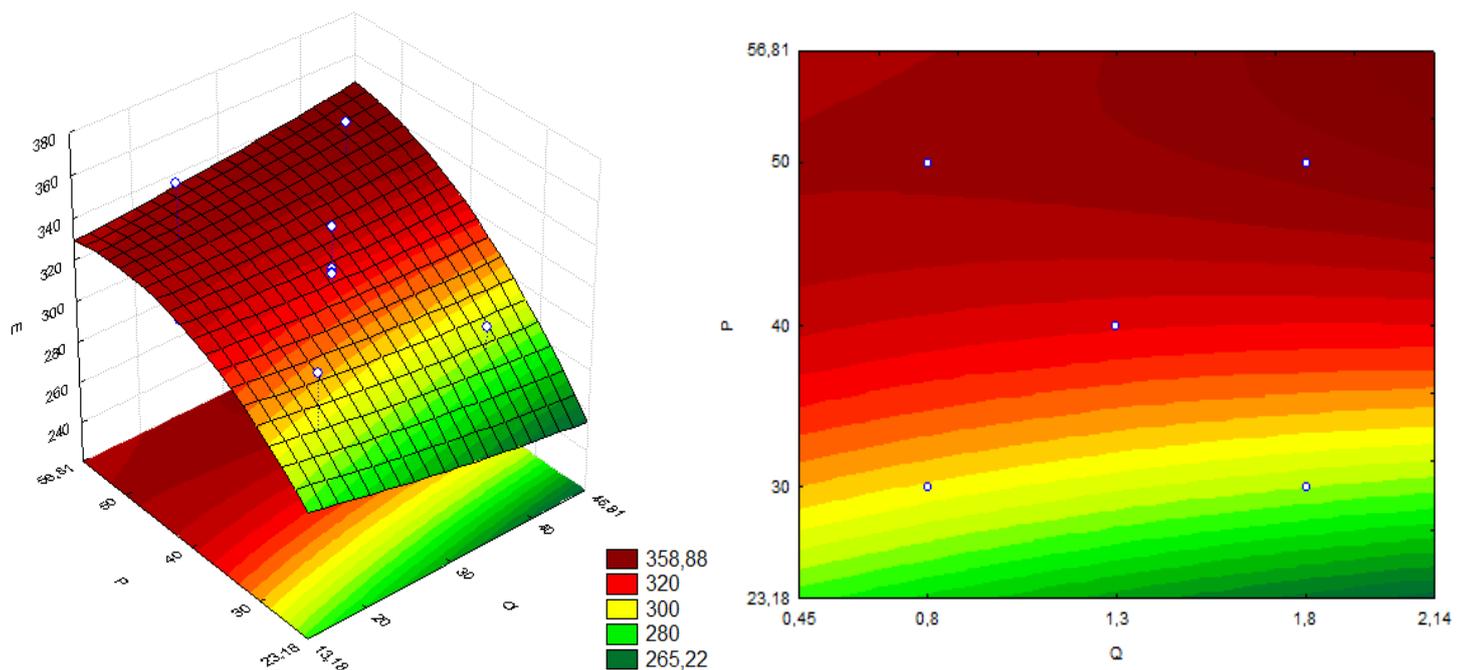
As Figuras 5.a, 5.b, e 5.c mostram as superfícies de resposta e curvas de nível geradas através do modelo proposto levando em consideração os pontos médios das concentrações de proteína miofibrilar liofilizada (PML), quitosana (Q) e plastificante (P).



**Figura 5a-** Superfície de resposta e curvas de nível para elongação (E), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e quitosana (Q %) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 5b-** Superfície de resposta e curvas de nível para alongação (E), relacionando concentração de proteína miofibrilar liofilizada (PML %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto



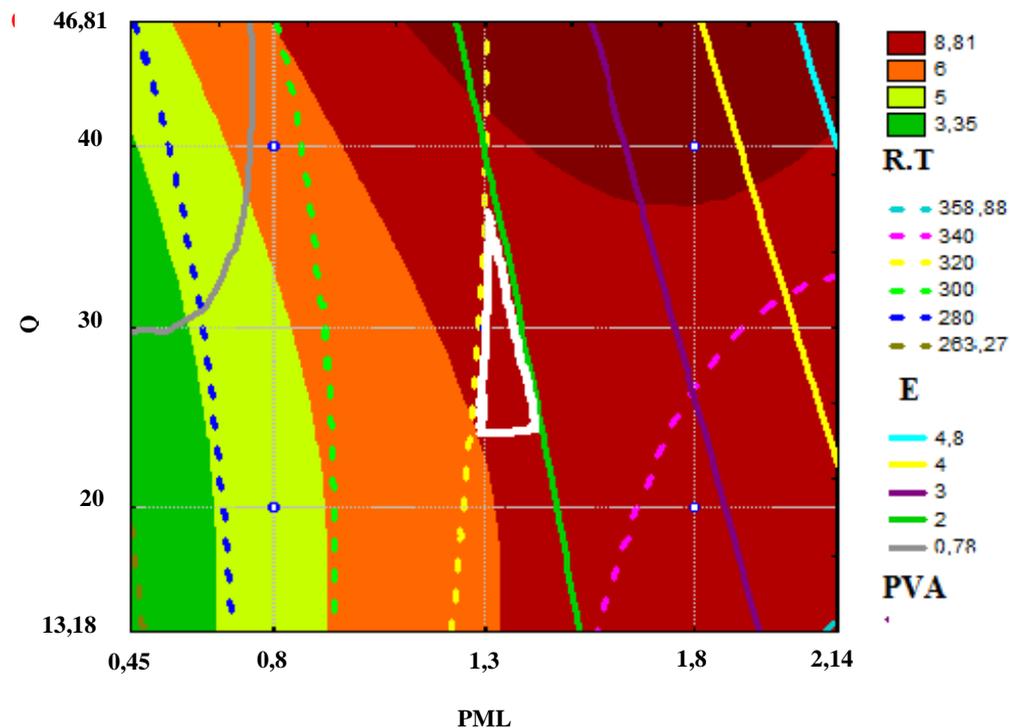
**Figura 5c-** Superfície de resposta e curvas de nível para alongação (E), relacionando concentração quitosana (Q %) e plastificante (P %) na obtenção de biofilme composto.

Analisando as Figuras 5a, 5b e 5c, verificou-se que os parâmetros que exercem maior influência sobre a alongação, é a concentração de proteínas miofibrilares liofilizada e a concentração de plastificante, reafirmando a análise dos efeitos. Levando em consideração

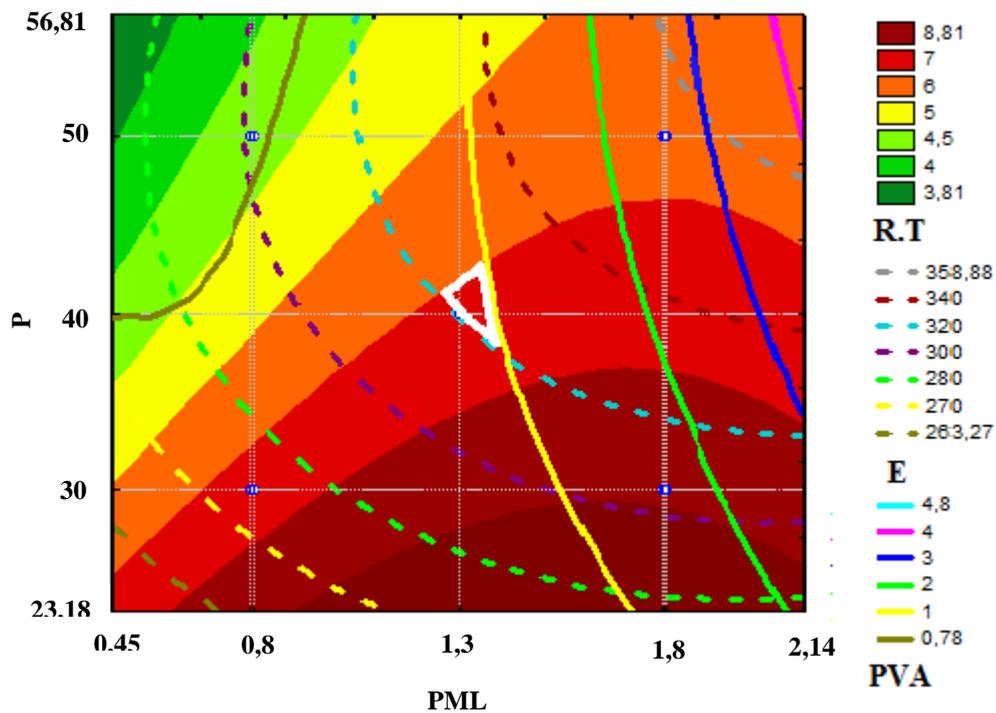
que para essa resposta espera-se maiores resultados, verificou-se também que a região onde se encontra os melhores resultados para alongação, estão entre: 1,3 a 2,14% de proteínas miofibrilares liofilizada, 13,18 a 46,81% de quitosana e 23,18 a 50% de plastificante. É possível observar na Tabela 4 que o melhor valor encontrado para alongação foi de 358,88%.

#### 5.4. SOBREPOSIÇÃO DOS GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E ESCOLHA DO PONTO ÓTIMO

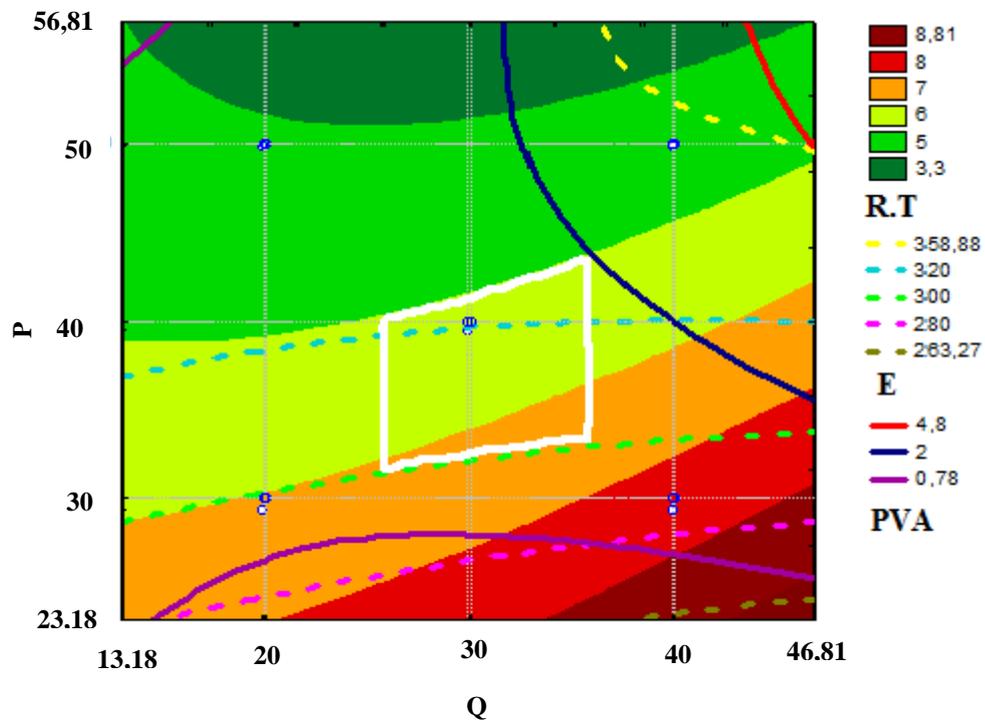
Inicialmente foram analisados os gráficos de superfície de resposta separadamente para avaliar as melhores regiões, as respostas apresentaram regiões ótimas distintas e a sobreposição dos gráficos foi realizada para fazer uma avaliação conjunta. As sobreposições encontram-se nas Figuras 6, 7 e 8, onde observa-se uma região branca, considerada ótima para o estudo, por apresentar condições intermediárias entre as respostas permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência a tração (RT) e alongação (E).



**Figura 6** - Sobreposição das curvas de contorno, resistência a tração (colorido), alongação (linha tracejada) e permeabilidade ao vapor de água (linha contínua) para proteína miofibrilar liofilizada (PML) e quitosana (Q) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 7** - Sobreposição das curvas de contorno, resistência a tração (colorido), alongação (linha tracejada) e permeabilidade ao vapor de água (linha contínua) para proteína miofibrilar liofilizada (PML) e plastificante (P) na obtenção de biofilme composto.



**Figura 8** - Sobreposição das curvas de contorno, resistência a tração (colorido), alongação (linha contínua) e permeabilidade ao vapor de água (linha tracejada) para quitosana (Q) e plastificante (P) na obtenção de biofilme composto.

Dentro da faixa de trabalho selecionada, que variou de 1,3 a 1,8% de proteínas miofibrilares liofilizada (PML), 40 a 46,81% de quitosana (Q) e 35% a 40% de plastificante (P) das Figuras 6, 7 e 8, optou-se em utilizar a seguinte condição ótima: PML: 1,3%, Q: 30% e P: 40%, que corresponde aos ensaios nos pontos centrais 15, 16 e 17 da Tabela 4.

A condição ótima selecionada, não foi a que apresentou o máximo valor obtido para nenhuma das repostas, uma vez que, para um melhor resultado de permeabilidade ao vapor de água, as repostas resistência a tração e alongação se encontravam com valores baixos. Desta forma, optou-se por selecionar uma condição intermediária para todas as repostas.

**Tabela 7** - Valores otimizados obtidos com metodologia de superfície de resposta e verificação experimental.

Condições otimizadas			Valor experimental	Valor predito	Desvio relativo (%)
PML	Q	P			
1,3%	30%	40%			
	PVA		1,714	1,804	5,250
	RT		6,575	6,242	5,064
	E		322,280	320,758	0,472

PML: proteína miofibrilar liofilizada; Q: quitosana; P: plastificante; PVA: ( $\times 10^{-10}$  g.m. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>); RT (MPa); E (%).

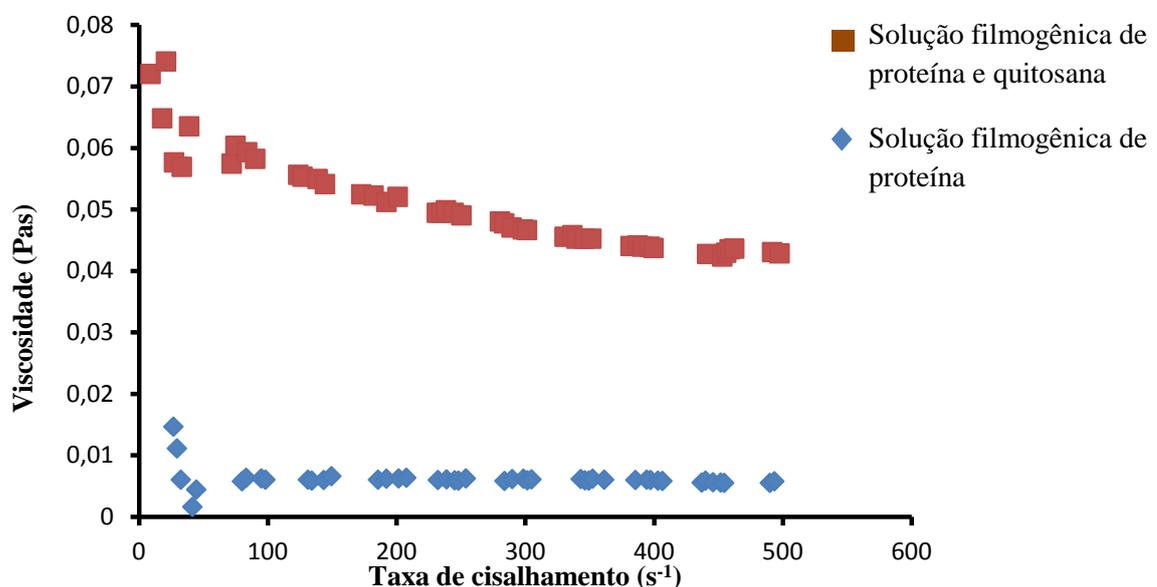
Como mostra a Tabela 7, os valores experimentais apresentaram-se bem próximos dos valores preditos pelos modelos das repostas estudadas, com valores de erros médios bastante reduzidos, ratificando que os modelos representaram de forma adequada as repostas no processo de obtenção de biofilme de peixe com adição de quitosana. Apesar do erro médio das repostas PVA e RT apresentarem valores de 5,250 e 5,064 respectivamente, ainda estão dentro do aceitável, pois Lomauro *et al.* (1985) consideram valores com erro relativo médio abaixo de até 10% .

## 5.5. CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS

Na elaboração de filmes biodegradáveis pelo método *casting*, o biopolímero passa por uma etapa de solubilização com água ou etanol e essa solução é depois seca em suportes ou pode ser aplicada diretamente sobre produtos alimentícios como cobertura. Quando se usa elevadas concentrações do biopolímero, ocorre uma alta viscosidade na solução filmogênica que dificulta a dissolução, manuseio e transporte. Em contraste, concentrações excessivamente baixas geram soluções muito diluídas com viscosidade muito baixa, podendo resultar em problemas associados com a incapacidade para formar películas ou revestimentos que podem aderir a um produto ou suporte específico. Por isso, é importante o conhecimento

das propriedades reológicas das soluções formadoras do filme para o desenho das operações de processo (PERESSINI *et al.*, 2003; HAN; GENNADIOS, 2005).

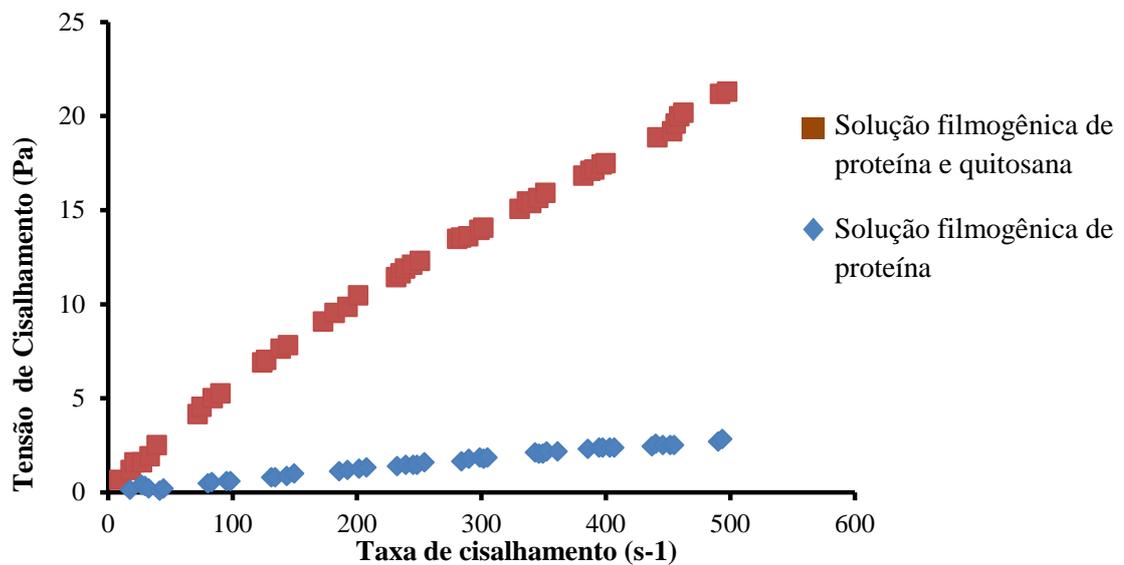
Analisando a Figura 9 verificam-se dois comportamentos distintos, onde a solução filmogênica somente de proteínas miofibrilares apresenta valores de viscosidade mais baixos tendendo ao fluido do tipo Newtoniano por apresentar comportamento linear, já que segundo Horn (2012), esse tipo de fluido não altera sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Comportamento contrário pode ser observado para solução de proteína adicionado de quitosana, onde observa-se nitidamente um aumento da viscosidade com a adição do polissacarídeo, indicando que a estrutura interna do fluido está mais resistente ao escoamento. Também pode ser visualizado que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, caracterizando-se como um fluido não Newtoniano com particularidades de pseudoplástico. Segundo Horn (2012), que também observou comportamento pseudoplásticos em soluções filmogênicas de quitosana e amido de milho, este é o tipo de fluido que ocorre com mais frequência em soluções filmogênicas e caracteriza-se por uma diminuição na viscosidade com o aumento na taxa de cisalhamento, o que está de acordo com o observado na presente pesquisa.



**Figura 9-** Comportamento das curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento

Na Figura 10, o gráfico relaciona tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento (curvas de fluxo), onde também pode ser visualizado comportamento não Newtoniano para a solução de proteínas miofibrilares com quitosana, devido a não linearidade da reta. Na solução somente de proteínas miofibrilares resulta em mudança de comportamento tendendo

para fluido do tipo Newtoniano, reafirmando a análise da Figura 9. Para descrever a mudança nas viscosidades em função da taxa de cisalhamento foram utilizados modelos matemáticos, nessa pesquisa, ambas soluções ajustaram-se ao modelo de Ostwald de Waele com bons valores de correlação linear ( $R^2$ ) de 0,98 e 0,99 para solução de proteína e proteína adicionado de quitosana respectivamente.



**Figura 10** – Comportamento das curvas tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento (curva de fluxo)

Desta forma, as formulações das soluções filmogênicas se apresentaram satisfatórias, mostrando adequada fluidez para produção de filmes pelo método de “*casting*” em escala laboratorial. Cuq *et al.* (1995), sugere a utilização de soluções filmogênicas com viscosidades abaixo de 0,7 Pa e as viscosidades encontradas nas soluções estudadas se mostraram abaixo deste valor limite.

Por outro lado, tratando-se de coberturas, segundo Farro (2008), estas necessitam de uma solução filmogênica que além de fluir sobre a superfície na qual são depositadas, tenha uma consistência que lhes permitam se auto sustentar. Nesse aspecto, a solução filmogênica de proteínas adicionada de quitosana é mais adequada, por possuir maior viscosidade, causada por uma maior concentração de sólidos solúveis, uma vez que é utilizado mais de um biopolímero nessa formulação (proteína e quitosana).

## 5.6. CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME COMPOSTO OTIMIZADO

Os resultados da caracterização mecânica, física, de barreira e cor do biofilme controle e do biofilme composto otimizado estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8:** Caracterização mecânica, física, de barreira e cor do biofilme controle e do biofilme composto otimizado

Determinações	Resultados	
	CONTROLE <sup>1</sup>	P Q <sup>2</sup>
<b>Espessura (mm)</b>	0,056±0,001 <sup>a</sup>	0,080±0,013 <sup>a</sup>
<b>Força na ruptura (N)</b>	7,139±0,460 <sup>a</sup>	11,588±0,503 <sup>b</sup>
<b>Resistência a tração (MPa)</b>	5,145±0,650 <sup>a</sup>	6,575±0,816 <sup>a</sup>
<b>Elongação (%)</b>	115,437±0,075 <sup>a</sup>	322,280±0,384 <sup>b</sup>
<b>PVA (g.m. m<sup>-2</sup>. s-1. Pa-1)</b>	6,56 x 10 <sup>-11</sup> ±3,93 E <sup>-12a</sup>	1,714 x 10 <sup>-10</sup> ±8,3E <sup>-12 b</sup>
<b>Solubilidade (%)</b>	31,876±0,404 <sup>a</sup>	10,704±0,696 <sup>b</sup>
<b>Intumescimento (m<sub>água</sub>/m<sub>sólidos secos</sub>)</b>	12,519±0,681 <sup>a</sup>	3,176±0,021 <sup>b</sup>
<b>Parâmetros de cor</b>		
<b>L*</b>	89,21±0,114 <sup>a</sup>	89,511±0,518 <sup>a</sup>
<b>a*</b>	-2,695±0,036 <sup>a</sup>	-4,295±0,035 <sup>a</sup>
<b>b*</b>	2,54±0,249 <sup>a</sup>	8,006±0,700 <sup>b</sup>
<b>H</b>	136,85±0,232 <sup>a</sup>	119,65±0,629 <sup>b</sup>
<b>C*</b>	3,705±0,211 <sup>a</sup>	9,091±0,477 <sup>b</sup>
<b>ΔE</b>	4,051±0,169 <sup>a</sup>	5,92±0,703 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Biofilme com 1,3% de PML e 40% de plastificante; <sup>2</sup> Biofilme composto otimizado com 1,3% de PML, 30 % de quitosana e 40% de plastificante. Letras iguais em colunas diferentes não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância (p ≤ 0,05).

### 5.6.1. Espessura

A espessura dos filmes influencia nas suas propriedades, logo o seu controle é importante para avaliar a uniformidade dos materiais, a repetibilidade da medida de suas propriedades, bem como a validade das comparações entre filmes. A partir da espessura é possível obter informações sobre a resistência mecânica e as propriedades de barreira ao vapor de água do material, uma vez que, à medida que se aumenta a espessura, mais resistentes são os filmes e maior a sua permeabilidade ao vapor de água (CUQ *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Uma ampla faixa de valores de espessura para filmes biodegradáveis tem sido reportado na literatura, Araújo (2015) obteve espessura de 0,033 mm onde a considera baixa e

correlaciona esse resultado com a pequena concentração de proteína que foi usada na elaboração do filme (0,78%). Tal comportamento é compatível ao obtido nesse trabalho, que com concentrações de proteínas maiores (1,3%) obteve espessura de 0,056 mm e quando adicionado de quitosana aumentou para 0,080 mm não apresentando diferença significativa a  $p \geq 0,05$  (Tabela 8). Zavareze *et al.* (2012), obtiveram espessuras variando de 0,137 a 0,223 mm e também usou a mesma justificativa ao relatar que a espessura dos filmes aumentou com o aumento da concentração de proteína. Garcia; Sobral (2005) explica esse comportamento quando diz que a espessura do filme é dependente da sua composição e dos parâmetros de processamento do filme, onde maiores concentrações de proteínas utilizadas na formulação induz o aumento de sólidos na matriz polimérica formada após a secagem da solução filmogênica e conseqüentemente produzindo filmes mais espessos.

Segundo Sobral (2000), nem sempre o efeito de possíveis variações das propriedades dos filmes é consequência da variação da espessura, porém é fundamental considerá-la. No entanto, o controle desse parâmetro dos biofilmes é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting*, onde os filmes são secos em suportes que exige controle rigoroso da forma do suporte e do nível da mesa da estufa, para evitar diferenças de espessura provocadas por desnível (MONTERREY-QUINTERO, 1998; MALI, 2002).

### **5.6.2. Propriedades mecânicas: força na ruptura, resistência a tração e alongação.**

O teste mais utilizado para medir as propriedades mecânicas de um filme é o teste de tração, onde podem ser derivadas suas propriedades que são resistência a tração (MPa) e alongação (%). A resistência a tração é a resistência oferecida pelo material no ponto da ruptura e a alongação é a relação percentual entre o alongamento do corpo de prova no teste e seu comprimento inicial (OLIVEIRA, 1996; SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002).

O biofilme de proteínas miofibrilares de peixe adicionado de quitosana obteve aumento tanto na resistência a tração, como na alongação quando comparado ao filme somente de proteínas miofibrilares, não apresentando diferença significativa para a resistência a tração (Tabela 8). Os maiores resultados de Zavareze *et al.* (2012) para resistência a tração foi 5,76 MPa e para alongação 193,1 %, Araújo (2015) obteve resistência a tração de 4,915 MPa e alongação de 178,08 % enquanto no presente trabalho o biofilme otimizado apresentou resistência a tração de 6,575 MPa e alongação de 322,280% (Tabela 8). Outro parâmetro que também exibiu melhor resultado, foi a força necessária para ruptura dos filmes que apresentou aumento significativo de 7,139N no filme de proteínas miofibrilares para 11,588N no filme de

proteínas miofibrilares adicionado de quitosana (Tabela 8). Monterrey-Quintero (2000) em biofilmes com proteínas miofibrilares de Tilápia-do-Nilo obteve força de 6,67N.

Resultados semelhantes foram relatados por Hosseini *et al.* (2013) em seu trabalho com filme de gelatina de peixe com quitosana, onde também observou melhoras nas características mecânicas do filme e ressaltou que a adição do polissacarídeo foi o responsável pelo aumento da flexibilidade do filme, sugerindo que a quitosana participa do enfraquecimento ou da redução do número de ligações de hidrogênio, atuando como plastificante ou agindo de forma sinérgica com o mesmo.

Tais resultados são bastante satisfatórios, uma vez que uma boa propriedade de barreira pode ser ineficiente se o filme não possuir boas propriedades mecânicas, pois os biofilmes precisam ser resistentes à ruptura, fazendo com que o alimento não perca sua integridade e o proteja no manuseio e transporte, e também devem possuir flexibilidade suficiente para adaptar-se a eventuais deformações sem se romper (GONTARD *et al.*, 1995, DAVANÇO, 2006).

### 5.6.3. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água é uma importante propriedade para aplicação de filmes como embalagens, pois por meio dela pode-se fazer a escolha de qual o tipo de produto mais adequado a ser acondicionado (McHUGH *et al.*, 1994).

Observou-se na presente pesquisa que a adição de quitosana no biofilme de proteínas miofibrilares de peixe não favoreceu os resultados de permeabilidade ao vapor de água, pois houve aumento significativo ( $p \geq 0,05$ ) do valor de PVA quando comparado com os filmes somente de proteínas (Tabela 8). Araújo (2015) que também trabalhou com proteínas miofibrilares de peixe obteve PVA de  $6,42 \times 10^{-11}$  g.m. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup> e Shiku *et al.* (2003), obtiveram como maior valor de PVA  $0,86 \times 10^{-10}$  g.m. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>. Pa<sup>-1</sup>. No entanto, esse comportamento pode ser justificado, uma vez que a quitosana apresenta alto grau de hidrofiliçidade.

Segundo Kim; Ustunol (2001), os polímeros hidrofílicos contêm grupos polares que permitem a formação de pontes de hidrogênio, favorecendo uma alta sorção de água, provocando uma taxa maior de permeação. Essa propriedade da quitosana é atribuída aos grupos desacetilados presentes em sua cadeia polimérica, que predominantemente são grupos amino caracterizados por ligações covalente (N-H), onde a eletronegatividade das ligações gera sítios de alta polaridade, tornando favorável o rearranjo das moléculas de água em torno desses sítios. Essa característica estrutural, associada aos grupos acetamido, que também são

polares e estão presentes na cadeia polimérica, caracterizam um material com alto grau de afinidade e retenção de água (ASSIS; ALVEZ, 2002; SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

#### 5.6.4. Solubilidade e intumescimento

A solubilidade e o intumescimento são propriedades relevantes dos filmes biodegradáveis, uma vez que para várias aplicações é necessário conhecer a resistência e o comportamento do material junto a água. A solubilidade informa sobre a quantidade de material hidrossolúvel presente nos filmes e o índice de intumescimento está diretamente relacionado com a solubilidade, sendo um parâmetro importante para o conhecimento das características gerais de um material (LEE *et al.*, 2004).

Após as 24 horas imersos em água e sob agitação o biofilme de proteína adicionado de quitosana exibiu melhoras significativas ( $p \geq 0,05$ ) no resultado de solubilidade quando comparado com o biofilme somente de proteínas miofibrilares, obtendo valores de 10,704%, e 31,876% respectivamente. Zavareze *et al.* (2012) e Cuq *et al.* (1995) também obtiveram maiores valores de solubilidade entre 26,5% a 28,0% e 33% a 47% trabalhando com filmes somente de proteínas miofibrilares. Hosseini *et al.* (2013) igualmente observou relevante aumento na resistência a água dos filmes de gelatina de peixe com quitosana e assegura que tais resultados podem provir de interações entre ambos os biopolímeros causadas por forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e etc. Essa redução da solubilidade com a adição de quitosana também já foi relatada na literatura por outros autores, Pereda *et al.* (2011) por exemplo, observou uma redução de cerca de 75% na solubilidade de filme de gelatina de couro bovino adicionado de quitosana.

Quanto ao intumescimento, Lee *et al.* (2004) e Horn (2012), relatam que as películas biopoliméricas incham quando absorvem água e em seguida sofrem alterações estruturais que afetam a estrutura interna, podendo influenciar na permeação, por isso, a análise de intumescimento faz-se necessária para se ter uma aplicação eficiente do biofilme. Os resultados obtidos sugerem que após 6 h de imersão em água o biofilme com quitosana ainda manteve parcialmente sua integridade, obtendo valor de intumescimento de  $3,176 \frac{m_{\text{água}}}{m_{\text{sólidos secos}}}$ , comportamento contrário ao observado para o biofilme somente de proteínas miofibrilares que obteve resultado significativamente maior  $12,519 \frac{m_{\text{água}}}{m_{\text{sólidos secos}}}$ , indicando que a adição de quitosana proporcionou maior estabilidade a água aos filmes. Oliveira (2013) ao estudar biofilmes de gelatina e quitosana também verificou que a mistura conferiu maior estabilidade do índice de intumescimento, mesmo comportamento observado por Kim *et al.* (2005) que afirma em sua pesquisa que filmes da mistura gelatina e quitosana

são mais estáveis que os obtidos por biopolímeros puros, indicando que biofilmes obtidos a partir de misturas podem apresentar melhores características para aplicações.

### 5.6.5. Transmissão de luz e transparência

Os resultados das análises transmissão de luz e transparência no biofilme otimizado são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Transmissão de luz e transparência do biofilme composto otimizado.

	Transmissão de Luz (%)							Transparência
	200 <sup>1</sup>	280	350	400	500	600	800	
<b>Controle</b> <sup>2</sup>	63,13 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>	75,2 <sup>a</sup>	82,4 <sup>a</sup>	86,1 <sup>a</sup>	86,533 <sup>a</sup>	87,6 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,005 <sup>a</sup>
<b>P Q</b> <sup>3</sup>	0 <sup>b</sup>	0,167 <sup>a</sup>	11,300 <sup>b</sup>	14,033 <sup>b</sup>	17,167 <sup>b</sup>	17,367 <sup>b</sup>	20,467 <sup>b</sup>	9,504 ± 0,0785 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Valores em negrito representam comprimento de onda (nm); <sup>2</sup> Biofilme controle com 1,3% de PML e 40% de plastificante; Biofilme composto otimizado com 1,3% de PML, 30 % de quitosana e 40% de plastificante. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

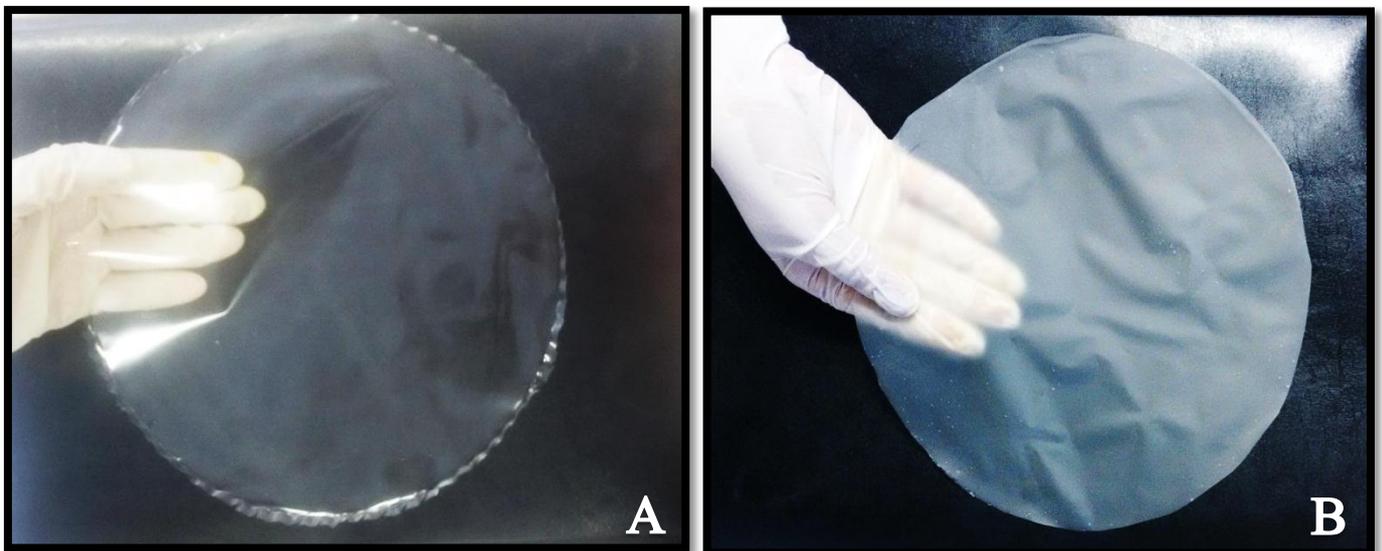
Propriedades óticas são essenciais para definir a capacidade de filmes e revestimentos para ser aplicado sobre uma superfície de alimento, uma vez que estas afetem a aparência do produto revestido (PEREDA *et al.*, 2012).

A transmissão de luz ou transmitância (%) de um filme é definida como a porcentagem total de luz incidente que é transmitida através do material. Um material transparente é definido como aquele que apresenta transmitância acima de 90% (SARANTOPOULOS *et al.*, 2002).

Com exceção do comprimento de onda 200 nm, todos os valores de transmitância para o biofilme de proteína adicionado de quitosana foram significativamente menores que os obtidos para o biofilme somente de proteínas miofibrilares (Tabela 9), indicando que o biofilme adicionado de quitosana não apresentou-se transparente, uma vez que exibiu valor de transmitância bem menor que 90%. No entanto, tais resultados indicam que o filme possui excelentes propriedades de barreira a luz UV, que causa a deterioração oxidativa de alimentos embalados, levando a perdas de nutrientes, descoloração e off flavors (MARTINS *et al.*, 2012).

Para transparência, os valores reportados na literatura para biofilmes somente de proteínas miofibrilares geralmente são baixos e ficam em torno de 1,97 a 3,47, caracterizando filmes transparentes (SHIKU *et al.*, 2004; ARAÚJO 2014). Comportamento contrário ao

observado nessa pesquisa que obteve valor de transparência para o filme de proteína adicionado de quitosana de 9,504 caracterizando um biofilme com tendência ao opaco e diferindo significativamente do biofilme somente de proteínas miofibrilares que obteve valor de 1,121 (Figura 11). Pelissari (2009) observou comportamento similar ao desse estudo ao caracterizar filmes de amido de mandioca, quitosana e glicerol, e obteve filmes mais opacos em altas concentrações de quitosana, sugerindo que a presença desse biopolímero possa originar filmes mais opacos e escuros, possivelmente devido a sua coloração amarelada característica, porém, filmes opacos também são importantes para o acondicionamento de alimentos, como os produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz, onde a proteção contra incidência de luz se faz necessária (RIGO, 2006).



**Figura 11:** A: Biofilme de proteínas miofibrilares com 1,3% PML e 40% P; B: Biofilme de proteínas miofibrilares adicionado de quitosana com 1,3% de PML, 30% Q e 40% P.

#### 5.6.6. Cor

A cor é um dos principais atributos de qualidade que afeta a percepção do consumidor (HUTCHINGS, 2005). Segundo Vicentini (2003) a cor pode ser considerada um importante parâmetro de caracterização dos biofilmes, pois está associada com a matéria-prima utilizada na elaboração dos mesmos, sendo normalmente avaliada o parâmetros  $L^*$  variando de 0 (preto) a 100 (branco),  $a^*$  do verde (-) ao vermelho (+) e  $b^*$  do azul (-) ao amarelo (+),  $h^*$  ângulo de tonalidade,  $C^*$  valor de croma e a diferença total de cor ( $\Delta E$ ).

Na Tabela 8 são apresentados os parâmetros de cor para os biofilmes, mostrando alto valor de luminosidade (89, 511) não apresentando diferença significativa entre o controle e o otimizado e próximos aos encontrados por Limpan *et al.* (2010) de 89,89 a 90,61,

demonstrando boa aparência, pois quanto mais próximo de 100 mais clara é a superfície. Tanto os valores de  $a^*$ , quanto os de  $b^*$  encontrados neste trabalho foram maiores que os relatados por Arfat *et al.* (2014) que variou de -1,15 a 2,28 e 1,27 a 7,36 respectivamente. Apenas o parâmetro  $b^*$  apresentou diferença significativa com maior valor para o filme otimizado indicando que o biofilme tem uma tendência a coloração amarela, devido a cor amarelada característica da quitosana, que pode ser interessante se o filme for utilizado com o objetivo de proteger alimentos sensíveis à reações de deterioração catalisadas pela luz (UGALDE, 2014).

O ângulo de tonalidade  $h^*$  apresentou diferença significativa entre o filme controle e o otimizado obtendo valores de 136,85 e 119,65 respectivamente, indicando uma coloração mais intensa para o filme adicionado de quitosana.

De acordo com Granato e Masson (2010), quanto maior os valores de croma, maior é a intensidade da cor das amostras. Foi observado que o valor de  $C^*$  foi de 3,705 e 9,091 para controle e otimizado, apresentando diferença significativa, indicando que o filme otimizado possui uma tendência mais intensa a coloração clara. Em relação a diferença total de cor ( $\Delta E$ ), pode-se afirmar que o biofilme com quitosana apresentou um resultado satisfatório de 5,92, não diferindo significativamente do controle e próximo ao encontrado por Arfat *et al.* (2014) de 7,67.

### 5.6.7. Análises térmicas

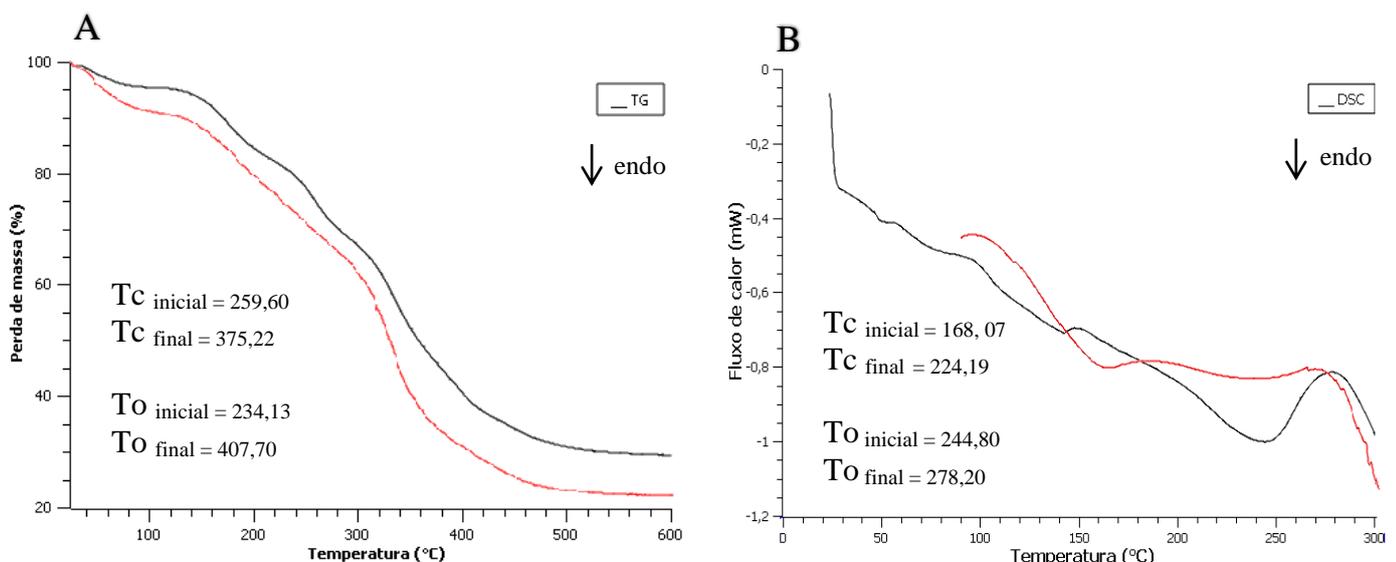
#### **Termogravimetria (TG) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

As técnicas de análise térmica, como a termogravimetria (TG) e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) são muito úteis no fornecimento de informações da estabilidade térmica de biofilmes à base de proteínas, como glúten, soja, gelatina e proteínas miofibrilares de peixe (GONTARD; RING, 1996; CHERIAN *et al.*, 1995; OGALE *et al.*, 2000; SOBRAL, 2000).

A termogravimetria (TG) é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e baseia-se no estudo do ganho ou perda de massa que ocorre na amostra pela variação da temperatura (ou do tempo à temperatura constante) (LUCAS *et al.*, 2001). E a calorimetria diferencial de varredura (DSC) é usada extensivamente para caracterização de materiais, monitorando o controle de qualidade dos produtos (LIU *et al.*, 1991).

Na análise termogravimétrica o biofilme controle e o otimizado exibiram duas principais fases de perda de peso (Figura 12 A). A primeira etapa observada em cerca de 30 a

100 °C foi possivelmente relacionado com a perda de água adsorvida e água ligada nas moléculas. Segundo Liu *et al.* (2009), a porcentagem de perda de massa nesta fase depende do teor de umidade presente na amostra. Na segunda fase que inicia em 259,60 e finaliza em 375,22 °C para o filme controle e 234,13 a 407,70 °C para o filme otimizado, está relacionada a degradação do biofilme. Desta forma, a análise termogravimétrica revelou que a degradação do filme à base de proteínas miofibrilares de peixe adicionado de quitosana apresentou uma melhor estabilidade térmica quando comparado ao filme só de proteínas miofibrilares, apresentando 69,651% e 74,627% de perda de massa respectivamente. Na pesquisa realizada por Nuthong *et al.* (2009), o principal estágio de perda de massa referente a degradação teve início em aproximadamente a 170 °C e a maior taxa obtida foi em 319,6°C, para filmes de proteína de plasma suíno, indicando que o biofilme em estudo apresentou maior estabilidade térmica, uma vez que obteve maiores temperaturas de degradação.



**Figura 12** – A: Curvas de TG e B: curvas de DSC para o controle (linha vermelha) com 1,3% de PML e 40% de plastificante e para o biofilme composto otimizado (linha preta) com 1,3% de PML, 30 % de quitosana e 40% de plastificante.

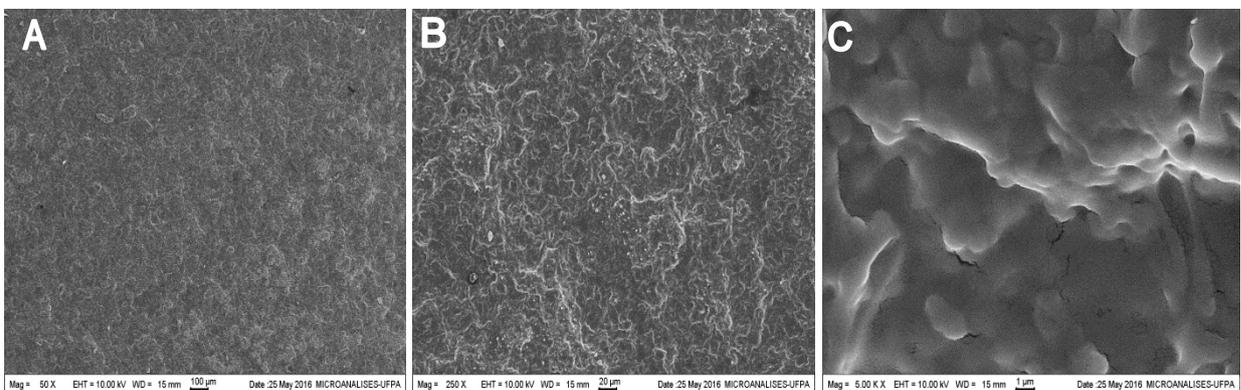
Nas curvas de DSC (Figura 12 B) o aquecimento resulta no surgimento de eventos endotérmicos, os de menor intensidade, também são relacionados a desidratação e os de maior intensidade referente a decomposição dos filmes que variou entre 168,07 à 224,19 e 244,80 à 278,20 °C para o filme controle e o otimizado respectivamente, demonstrando que o biofilme apresenta boa resistência a altas temperaturas e que a adição de quitosana ocasionou uma maior estabilidade térmica ao biofilme, reafirmando os resultados da TG. Segundo Nuthong *et al.* (2009), os picos observados a partir de termograma de DSC, normalmente reflete a

perturbação da fase ordenada das moléculas na matriz do filme, que durante o aquecimento acarreta numa gradual destruição da sua estrutura, confirmando os resultados obtidos nesse estudo.

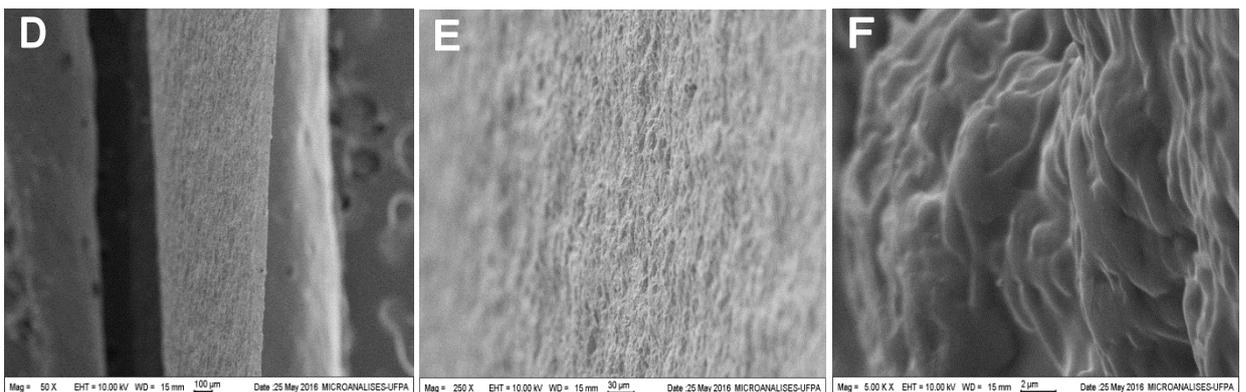
Desta maneira, o conhecimento da temperatura inicial de decomposição térmica dos biofilmes são importantes, uma vez que indicam o limite máximo de temperatura no processo de obtenção do biofilme, bem como, em quais condições de temperatura eles podem ser aplicados sem comprometer sua funcionalidade.

### 5.6.8. Caracterização microscópica da superfície e secção transversal

As micrografias da superfície e da secção transversal do filme otimizado estão representados na Figura 10 e 11 respectivamente.



**Figura 13:** Microfotografias da superfície do biofilme: A: 50X, B: 250X e C:5000X respectivamente.



**Figura 14:** Microfotografias do corte transversal do biofilme D: 50X, E: 250X e F:5000X

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta importante para entender as propriedades dos biofilmes, pois permite a obtenção de informações estruturais das amostras como a homogeneidade ou a presença de rupturas e falhas que podem afetar as propriedades mecânicas e de barreira do biofilme (ALMEIDA *et al.*, 2013).

A análise da superfície (Figura 10) e do corte na transversal (Figura 11) do biofilme mostra uma matriz coesa, porém irregular, apresentando rugosidades e pequenas rachaduras (C). No entanto, a estrutura do filme apresenta-se de forma densa e compacta, indicando uma estrutura forte e resistente, o que condiz com as propriedades mecânicas do filme que apresentaram bons resultados. Esse caráter compacto exibido na superfície do filme também pode ser responsável pelos baixos valores de solubilidade obtidos no trabalho, pois, com resultados similares ao dessa pesquisa, Gontard (1992) também observou que os filmes com microestrutura mais densa e compacta apresentavam menores valores de solubilidade e maior força na ruptura.

Mesmo a matriz do biofilme não se mostrando muito homogênea e apresentando rugosidade (C, F), não se caracteriza uma separação de fases. Segundo Mali *et al.* (2002) quando um filme possui uma boa homogeneidade da matriz, é um bom indicador da integridade de sua estrutura, bem como de suas propriedades mecânicas. Ainda sobre a integridade do filme, Souza; Sobral; Menegalli, (2004), diz que a presença de fendas e/ou de irregularidades nas estruturas dos biofilmes pode comprometer essa integridade e estrutura do biofilme, provocando modificações nas suas propriedades funcionais, no entanto, apesar da superfície rugosa e de algumas rachaduras encontradas no filme em estudo, o mesmo apresentou excelentes características físicas e mecânicas.

## 6. CONCLUSÃO

As proteínas miofibrilares extraídas das aparas da dourada apresentaram teor proteico de 94,42% e mostraram-se excelentes matérias-primas para a elaboração de biofilmes com adição de quitosana.

O filme com 1,3% de proteína, 30% de quitosana e 40% de plastificante foi selecionado por apresentar condições intermediárias nas respostas: resistência a tração, alongação e permeabilidade ao vapor de água.

A adição de quitosana aumentou a viscosidade quando comparado com solução filmogênica somente de proteínas miofibrilares, deixando a estrutura interna do fluido mais resistente ao escoamento e caracterizando-se como fluido não Newtoniano com particularidades de pseudoplástico, apresentando adequada fluidez para produção de filmes pelo método de “*casting*” e para ser aplicado como cobertura.

O biofilme apresentou elevados valores de resistência a tração alongação e baixa solubilidade e intumescimento.

A transparência indica um filme com tendência ao opaco, com excelente propriedade de barreira UV podendo ser utilizado em alimentos sensíveis a luz.

O biofilme também apresentou boa estabilidade térmica e a microestrutura revelou estrutura pouco homogênea, porém coesa e densa.

Os resultados indicam que houve a formação de biofilme com propriedades melhoradas quando comparado com o biofilme controle, podendo ser utilizado como material de embalagem de alimentos.

## REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma NBR-10004: **Resíduos sólidos**. Rio de Janeiro; 2004.
- AGUIAR, G. P. S; GOULART, G. A. S. Utilização de material residual da indústria de pescado para obtenção de óleo e farinha. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 7, p. 55-60, 2013.
- AGULLÓ, E; RODRÍGUEZ, M. S; RAMOS, V; ALBERTENGO, L. Present and future role of chitin and chitosan in food. **Macromolecular Bioscience**, v. 3(10), p. 521–530. 2003.
- ALONSO, J. C. **Padrão espaço temporal da estrutura populacional e estado atual de exploração pesqueira da dourada *Brachyplatystoma flavicans*, Castelnau, 1855 (Siluriformes, Pimelodidae) no sistema estuário- Amazonas-Solimões**. 216 p. Tese (Doutorado em Biologia de água doce e pesca interior)- Instituto Nacional de Pesquisas Amazônica/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2002.
- AMARANTE, C; BANKS, N. H; GANESH, S. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. **Postharvest Biology and Technology**, v. 21, p. 291-301, n. 3. 2001.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. D 1746: Standard Test Method for Haze and Luminous Transmittance of Transparent Plastics. Philadelphia (Annual Book of ASTM Standards), 1997.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**: 16.ed. Washington, v.2, 850 p. 1997.
- ARANAZ, I; MENGIBAR, M; HARRIS, R; PANOS, I; MIRALLES, B; ACOSTA, N; GALED, G; HERAS, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**. v. 3, p. 203–230. 2009.
- ARAÚJO, C. S. **Obtenção e caracterização de biofilme a partir de proteínas miofibrilares de subproduto de peixe**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Pará. 2015.
- ARFAT, Y. A; BENJAKUL, S; PRODPRAN, T.; OSAKO, K. Development and characterisation of blend films on fish protein isolate and fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 58-67. 2014.

ASSIS, O. B. G; ALVES. H. C. Metodologia Mínima para a Produção de Filmes Comestíveis de Quitosana e Avaliação Preliminar de seu Uso como Revestimento Protetor em Maçãs Cortadas. EMBRAPA. **Comunicado técnico 49**. ISSN 1517-4786, São Carlos, SP, 2002.

AVÉROUS, L; FRINGANT, C; MORO, L. Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites. **Polymer**. v. 42, p. 6565-6572. 2001.

BANKER, G.S. Films coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Science**. v.55. n.1. p.81-89. 1966.

BARTHEM, R. B; GOULDING, M. **Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos**. Série Estudos do Mamirauá, SCM, CNPq/MCT, IPAAM. Brasília. v..3. p.129. 1997.

BATISTA, J. S. **Estimativa da variabilidade intraespecífica da dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) (Castenau, 1855) no eixo estuário- Amazonas- Solimões**. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água doce e Pesca Interior)- Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2003.

BENTES, A. S; SOUZA, H. A. L; MENDONÇA, X. M. F. D. Caracterização física e química e perfil lipídico de três espécies de peixes amazônicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindústria**. v. 03, n. 02, p. 97-108. 2009.

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

BEZERRA, R. S; SANTOS, J. F; PAIVA, P. M. G; CORREIA, M. T. S; COELHO, L. C. B; VIEIRA, V. L. A; CARVALHO, J. R. L. B. Partial purification and characterization of thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossomacropomum*). **Journal Food Biochemistry**, v.25, n.3, p.199-210, 2001.

BLAIR, H. S; GUTHRIE, J; LAW, T. K; TURKINGTON, P. Chitosan and modified chitosan membranes. I. Preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**. v.33, p. 641-656. 1987.

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

BOF, M. J; BORDAGARAY, V. C; LOCASO, D. E; GARCIA, M. A. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. **Food Hydrocolloids**. V. 51, p. 281- 294. 2015.

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.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 91 de 11 de maio de 2001: **Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos**. Brasília, 2001.

CARVALHO, A. F. de. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1997.

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

CHEOW, C. S; NORIZAH, M. S; KYAW, Z. Y; HOWELL, N. K. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 386–391, 2007.

CHERIAN, G; GENNADIOS, A; WELLER, C; CHINACHOTI, P. Thermomchanical behavior of wheat gluten films: effects of sucrose, glycerin, and sorbitol. **Cereal Chemistry**, v.72, n.1, p.1-6, 1995.

CHILLO, S; FLORES, S; MASTROMETTEO, M; CONTE, A; GERSCHENSON, L; DEL NOBILE, M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, v.88, p. 159-168, 2008.

CUQ, B; GONTARD, N; CUQ, J. L; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein – based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 3, p. 580- 584, 1996.

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

CUQ, B; GONTARD, N; CUQ, J. L; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Agricultural and Food Chemistry**. v. 45; n.3; p. 622-626, 1997.

DAVANÇO, T. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou ácido capróico e surfactantes**.155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - UNICAMP, Campinas (SP). 2006.

DI PIERO, R. M; GARDA. M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasília, Brasília**, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

DI PIERRO, P; CHICO, B; VILLALONGA, R; MARINIELLO, L; DAMAIO, A. E; MASI, P; PORTA, R. Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 3, p. 744-749, 2006.

DUTTA, P. K; TRIPATHI, S; MEHROTRA, G. K; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**. v. 114, p. 1173–1182. 2009.

FAO – Food and Agricultural Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture 2006 (SOFIA). FAO. 180p. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/home/en/>>. Acesso em: 14 Ago 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720>> . Acesso em: 14 Ago 2015.

FARRO, P. C. A. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa Willdenow*) da variedade “Real”**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos /Universidade Estadual de Campinas. 2008.

FENNEMA, O. R; DAMODARAN, S; PARKIN. K, L. Química de Alimentos de Fennema. Porto Alegre. 4. Ed. p.900. 2010.

FERREIRA, E. J; SANTOS, G. M; JEGU, M. Aspectos ecológicos da ictiofauna do rio Mucajaí, na área do Paredão, Roraima, Brasil. **Amazoniana**, n.3. p. 339-352. 1988.

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

GERRARD, J.A. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science and Technology**. v. 13, p. 391–399. 2002.

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

GONTARD, N; DUCHEZ, C; CUQ, J-L; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 39-50, 1995.

GONTARD, N; RING, S. Edible wheat gluten films: influence of water content on glass transition temperature. **Journal of Food Science**, v.44, n.11, p. 3474-3478, 1996.

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

GONTARD, N; GUILBERT, S. Bio-packaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da SBCTA**, 30(1), 3–15. 1996.

GONTARD, N; GUILBERT, S; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**. v. 57, p. 190–195. 1992.

GOUNGA, M. E; XU, S. Y; WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as effected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**. v. 83, p. 521–530. 2007.

GRANATO, D; MASSON, M. L. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 30, n. 4, p. 1090-1096, 2010.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In “Food Packaging and Preservation. Theory and Practice”, ed. M. Mathlouti. **Elsevier Applied Science Publishing**, p.371. 1986.

HAN, J. H; GENNADIOS, A. Edible films and coatings: a review. **Innovations in Food Packaging**. ISBN: 0-12-311632-5. 2005.

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

HOQUE, M. S; BENJAKUL, S; PRODPRAN, T. Effect of heat treatment of film forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 96 (1), p. 66-73. 2010.

HORN, M. M. **Blendas e filmes de quitosa/amido: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. 147 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – São Carlos, 2012.

HOSSEINI, S. F; REZAEI, M; ZANDI, M; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**. p. 1490–1495. 2012.  
HUNTERLAB INC. Applications Note: CIE L \* a \* b \* Color Scale. v. 8, n. 7, p. 1–4, 2008.

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

HUTCHINGS, J. B. Color Measurements. **Encyclopedia of Analytical Science**, p.198-208, 2005.

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.

JABEEN, F; CHAUDHRY, A. S. Chemical compositions and fatty acid profiles of three fresh water fish species. **Food Chemistry**, v. 125, p. 991-996, 2011.

JEON, Y.I; KAMIL, J. Y. V. A; SHAHIDI, F. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, p. 5167–5178. 2002.

KESTER, R; FENNEMA, O. R. Edible Films and Coatings: A review. **Food Technology**. v. 40, p. 47-59. 1986.

KIM, S-J; USTUNOL, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of wheyprotein- based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 49, n.9, p. 4388-4391, 2001.

KIM, S; NIMINI, M. E; YANG, Z; HAN, B. Chitosan/gelatina-based films crosslinked by proanthocyanidin. **J. Biomed Mater Res Part B**. v.75. p. 442-450. 2005.

KROCHTA, J. M; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**, v.51, n.2, p. 60-74, 1997.

KROCHTA, J. M; BALDWIN, E.A; NISPEROS-CARRIEDO, M. Edible Films and Coatings to Improve Quality. Lancaster, PA: **Technomic Publishing Company**. 379p. 1994.

KUBITZA, F; CAMPOS, J. L. O aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 94, p. 23-29, 2006.

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

LARSEN, R; EILERTSEN, K.E; ELVEVOLL, E.O. Health benefits of marine foods and ingredients. **Biotechnology Advances**, v.29, p.508-518, 2011.

LEE, K. Y; SHIM, J; LEE, H.G. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 51-54, 2004.

LIMA, L. K. F. de. Reaproveitamento de resíduos sólidos na cadeia agroindustrial do pescado. **Embrapa Pesca e Aquicultura**. ISSN 2318-1400. Palmas- TO. Julho, 2013.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos: quitosana / insulina**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

LIMA, V. L. A. G; MÉLO, E. A; GUERRA, N. B. “Correlação entre o teor de antocianinas e caracterização cromática de polpas de diferentes genótipos de aceroleira”, **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.1, p.51-55, 2007.

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

LIU, H. XIE, F; YU, L; CHEN, L; LI, L. Thermal processing of starch-based polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 12, p. 1348-1368, dez. 2009.

LIU, H; LELIEVRE, J; AYOUNG-CHEE, W. A study of starch gelatinization using differential scanning calorimetry X-ray, and birefringence measurements. **Carbohydrate Research**. V. 210, 79-87. 1991.

LUCAS, E; SOARES, B. G; MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: Editora e-papers. 366 p. 2001.

MALI, S; GROSSMANN, M.V.E; GARCIA, M.A; MARTINO, M.N; ZARITZKY, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p. 379-386, 2002.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 255p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2008.

MARTINS, J. T; CERQUEIRA, M. A; VICENTE, A. A. Influence of a-tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, 27, 220–227. 2012.

McHUGH, T. H; AUJARD, J. F; KROCHTA, J. M. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n.1, p. 416-419, 423, 1994.

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

MONTERREY-QUINTERO, E. S. **Caracterização Físico-química de Proteínas Miofibrilares e Elaboração de Biofilmes**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, na área de Concentração de Qualidade e Produtividade Animal)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Pirassununga. 1998.

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.

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

OGALE, A. A; CUNNINGHAM, P. L; DAWSON, J.C; ACTON, J. C. Viscoelastic, Thermal, and Microstructural Characterization of Soy Protein Isolate Films . **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p.672-679, 2000.

OGAWA, M; MAIA, E. L; Manual de pesca. **Ciência e Tecnologia do Pescado**. São Paulo, SP. Livraria Varela. p. 293-299, v.01 ,1999.

OLIVEIRA, A. P. R. Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o estudo do processo de reticulação. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo-USP. 2013.

OLIVEIRA, L. M; SARANTÓUPOLOS, C. I. G. L; CUNHA, D. G; LEMOS, A. B. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem, 1996.

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 Science**, v. 35, p.205-210. 2005.

PAULO J. do A; SANTOS, JULIANA S. dos, GARCIA FARAH 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**. 2004.

PELLISSARI, F. M; GROSSMANN, M. V. E; YAMASHITA, F; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with orégano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, p. 7499-7504, 2009.

PEREDA, M; AMICA, G; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1318–1325.2012.

PEREDA, M; PONCE, A. G; MARCOVICH, N. E; RUSECKAITE, R. A; MARTUCCI, J. F. Chitosan–gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, 25, 1372–1381. 2011.

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

PIRES, C; RAMOS, C; TEIXEIRA, G; BATISTA, L; MENDES, R; LUNES, I; MARQUES, A. Characterization of biodegradable films prepared withhake proteins and thymeoil. **Journal of Food Engineering**. v. 105, p.422-428. 2011.

PIRESTANI, S; ALI SAHARI, M; BARZEGAR, M; SEYFABADI, S. J. Chemical compositions and minerals of some commercially important fish species from the South Caspian Sea. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 39-44, 2009.

PORTA, R; MARIELLO, L; DIPIERRO, P; SORRENTINO, A; GIOSAFATTO, C. V. Transglutaminase cross linked pectin- and chitosan based edible films. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 51, 223, 238. 2011.

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

PROVÁRZEA. O manejo da pesca dos grandes Bagres migradores. Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões-Amazonas. Brasília. IBAMA, 2005.

QUARASHI, M. T; BLAIR, H. S; ALLEN, S. J. Studies on modified chitosan membranes. II. Dialysis of low molecular weight metabolites. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 46, p. 263-269. 1992.

RIBEIRO, S. C. A; PARK, K. J; HUBINGER, M. D; RIBEIRO, C. F. A; ARAUJO, E. A. F; TOBINAGA, S. Otimização da desidratação osmótica de filés de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) através da metodologia de superfície de resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v. 28(2). p.485-492, abr-jun. 2008

RIGO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, campus de Erechim, 2006.

SANTOS, J. E; SOARES, J. P; DOCKAL, E. R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. **Embalagens plásticas flexíveis, principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002.

SATHIVEL, S; LIU, Q; HUANG, J; PRINYAWIWATKUL, W. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. **Journal of Food Engineering**, v. 83, p. 366–373. 2007.

SCHROOYEN, P. M. M; DIJKSTRA, P. J; OBERTHUR, R. C. Thermal and mechanical properties of films. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**. v. 49, n. 1, p. 221-230. 2001.

SHAHIDI, F; ARACHCHI, J. K. V; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, p. 37–51. 1999.

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

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

SIGNINI, R; CAMPANA-FILHO, S. P. Características e Propriedades de Quitosanas Purificadas nas Formas Neutra, Acetato e Cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 11, p. 58-64. 2001.

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

SOTHORNVIT, R; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. **Innovations in Food Packaging**. Academic Press. p.403-433. 2005.

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

SOUZA, S. M. A. de; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Propriedades físicas de filmes comestíveis a base de proteínas miofibrilares de carne bovina. **Ciências Agrárias**. Londrina, v. 33, n. 1, p. 283-296, jan./mar. 2012.

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

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

SUCASAS, L. F. A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade da cadeia produtiva**. 164 p Tese (Doutorado)- USP. São Paulo. 2011.

SUTO, S; UI, N. Chemical crosslinking of hydroxypropyl cellulose and chitosan blends. **Journal of Applied Polymer Science**. v.61, p. 2273–2278. 1996.

SUZUKI, T. Tecnologia de las proteínas de pescado y krill. Zaragoza: Acribia, 230 p. 1987.  
TACO- Tabela brasileira de composição de alimentos. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação – NEPA. 4. ed. p.161. UNICAMP. Campinas. 2011.

TAHERGORABI, R; BEAMER, S. K; MATAK, K. E; JACZYNSKI, J. Chemical properties of x-3 fortified gels made of protein isolate recovered with isoelectric solubilisation/precipitation from whole fish. **Food Chemistry**, n.139, p.777–785, 2013.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14(3), p.71-78. 2003.

TORRES, J. A. Edible films and coatings from proteins. **Protein functionality in food systems**. New York: M. Dekker, p.467-507. 1994.

TUAL, C; ESPUCHE, E; ESCOUBES, M; DOMARD, A. Transport properties of chitosan membranes: Influences of cross linking. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 38, p. 1521–1529. 2000.

TUNICK, M. H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.83, n.8, p.1892-1989, 2000.

UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 2014.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 198 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu/SP, 2003.

VIDOTTI, R. M. 2011 Tecnologias para o aproveitamento integral de peixes. Disponível em: [\\_rose-vidotti\\_tecnologias-para-o-proveitamentointegral-de-peixes.pdf](#)> Acesso em: 07 Jun. 2015.

WANG, L; AUTY, M. A. E; RAU, A; KERRY, J. F; KERRY, J. P. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. **Journal of Food Engineering**. v. 90, p.11–19. 2009.

WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes Elaborados a partir de fibra e pó de colágeno**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos- Área de concentração: Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual Paulista- São José do Rio Preto. 2007.

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

YAO, K. D; LIU, J; CHENG, G. X; LU, X. D; TU, H. L; DA SILVA, J. A. L. Swelling behaviour of pectin/chitosan complex films. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 60, p. 279- 283. 1996.

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

ZAVAREZE, E. R; MELLO S. L; HERNÁNDEZ, T. C. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. **Brazilian Journal of Food Technology**. IV SSA, maio 2012.

