



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO
PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) E ARGILA ORGANOFÍLICA**

RIO GRANDE, RS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO
PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) E ARGILA ORGANOFÍLICA**

WILLIAM RENZO CORTEZ VEGA

Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Tese apresentada como um dos requisitos
para a Obtenção do título de Doutor em
Engenharia e Ciência de Alimentos

Prof. Dr. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
Orientador

RIO GRANDE, RS

2011

A vida é como uma pedra de amolar, tanto pode desgastar-nos como afiar-nos, tudo depende do metal de que somos constituídos.

(Bernard Shaw).

DEDICO

A Deus, Pela minha vida, pela força e coragem necessárias que me deu para vencer esta caminhada importante em minha vida.

A minha mãe Maria Vega Ramirez, pelo seu apoio incansável e confiança, que muitas vezes renunciou a seus sonhos para que os meus se realizassem, ao meu pai Edmundo e meu irmão Franco pelo apoio e carinho. E a toda minha família, que são exemplo de luta e esforço, que juntos formam uma base forte de confiança sobre a qual eu posso caminhar...

A Sandriane pelo apoio e paciência incondicional, estando presente em todos os momentos, e por tudo que representa na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar, mesmo nos momentos de dificuldades, me ajudando a vencer os maiores obstáculos de minha vida.

À CAPES PEC-PG, pela bolsa concedida através do convênio bilateral educativo Peru – Brasil de apoio à formação de pesquisadores em países de América Latina.

Ao CNPQ pelo financiamento do trabalho

A Universidade Federal do Rio Grande pela oportunidade de realizar meu doutorado nesta instituição.

Primeiramente agradeço a minha mãe, exemplo de pessoa que constantemente me estimula com conselhos e ensinamentos a superar os obstáculos da vida. Principalmente desde o ano passado que vem me mostrando qual forte ela é lutando contra o câncer. Ao meu pai e meu irmão pelo carinho, incentivo e apoio sempre recebidos. A toda minha família por acreditarem nos meus projetos e aceitarem fazer parte deles.

Ao Professor Dr. Carlos Prentice Hernández pela orientação deste doutorado, pelos conhecimentos proporcionados durante o transcurso do curso, pelo apoio e amizade, e pelos valiosos ensinamentos no desenvolvimento deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, em especial aos professores Myriam de las Mercedes Salas-Mellado, Luiz Antonio de Almeida Pinto, Eliana Badiale Furlong pelos conhecimentos proporcionados e pela amizade.

À professora e amiga Vilásia, por compartilhar momentos amenos, pelo incentivo e amizade.

Ao professor Gustavo Fonseca pela grande amizade e os conselhos recebidos.

Aos professores membros da banca pelas sugestões

Aos meus estagiários, meu obrigado por me permitirem compartilhar meu conhecimento, ainda que pouco, mais sobretudo, pela oportunidade de ensinar: Bernardo Zanette, Daniela Bagatini, Juliana Andreghetto e Leilane Rech, pelo apoio que recebi de cada um deles e pelas longas horas de trabalho compartilhadas comigo.

Especialmente a Sandriane, meu amor,... pelo auxílio, pelo companheirismo ao longo desta caminhada, por me ensinar que desafios surgem para serem superados, que realização é reflexo de entusiasmo e, finalmente, por me mostrar que o amor deve ser sempre a razão de tudo!

Ao amigo Antonio López Villanueva que me auxiliou nas análises realizadas na UFRGS.

Aos amigos Adriano, Fabiano e Felipe, pela ajuda e auxílio que recebi de cada um deles, e pela grande amizade, companheirismo e pelos momentos no cruz.

Aos colegas do curso, de maneira especial a Kelly, Cristiano, Catarina, Ana Priscila, Guilherme, Francisco, Roberta, Elisangela Radmann, Irene, Vanessa Ribeiro, pelo companheirismo e por compartilhar momentos amenos.

À nossa secretária da Pós-Graduação Islanda, pelo apoio no requerimento de documentos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Marcondes, Rafael, Carolina, Ariane, Ana Paula, Renata, Inajara, Sabrine, Gilberto, Annie, Bruno e Dennis pela amizade e pelo apoio que recebi de cada um de eles.

Enfim, a todas as pessoas aqui não mencionadas, mas não esquecidas que, de uma forma ou outra, me ajudaram a vencer mais uma etapa.

SUMÁRIO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	2
1.1 INTRODUÇÃO.....	3
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo geral.....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 PESCADO.....	6
2.1.1 Composição do pescado.....	6
2.1.2 Proteínas do pescado.....	7
2.1.3 Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>).....	8
2.1.4 Isolado protéico de pescado.....	9
2.2 PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS.....	12
2.2.1 Obtenção de filmes biodegradáveis pelo método de “ <i>casting</i> ”.....	13
2.2.1.1 Plastificantes.....	13
2.2.1.2 Compósitos.....	14
2.2.1.3 Nanocompósitos.....	14
2.2.2 Filmes de proteína.....	19
2.3 PROPRIEDADES DOS FILMES.....	21
2.3.1 Espessura.....	22
2.3.2 Cor e transparência.....	22
2.3.3 Propriedades mecânicas.....	23
2.3.4 Propriedades de barreira.....	23
2.3.5 Cristalinidade.....	24

2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
2.3 APLICAÇÃO DOS FILMES.....	26
CAPÍTULO 3. PREPARO DE CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA.....	27
3.1 INTRODUÇÃO.....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.2.1 Matéria-prima.....	29
3.2.1.1 Caracterização da matéria-prima.....	30
3.2.2 Processo tecnológico para obtenção de isolado protéico de corvina.....	30
3.2.2.1 Descrição do processo.....	32
3.2.3 Caracterização do IPC.....	33
3.2.3.1 Composição proximal.....	33
3.2.3.2 Propriedades funcionais.....	33
3.2.3.2.1 Solubilidade.....	33
3.2.3.2.2 Determinação da capacidade de retenção de água (CRA).....	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.3.1 Caracterização da matéria-prima.....	34
3.3.2 Composição proximal do IPC.....	35
CAPÍTULO 4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA (<i>Micropogonias furnieri</i>) E ARGILA ORGANOFÍLICA.....	41
4.1 INTRODUÇÃO.....	40
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.2.1 Matéria-prima.....	42
4.2.2 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES NANOCOMPÓSITOS DE IPC e MMT.....	42
4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES NANOCOMPÓSITOS.....	45
4.2.3.1 Avaliação subjetiva.....	45
4.2.3.2 Espessura.....	45
4.2.3.3 Propriedades mecânicas.....	45
4.2.3.4 Permeabilidade ao vapor de água.....	47
4.2.3.5 Solubilidade do filme em água.....	49
4.2.3.6 Transparência.....	49
4.2.3.7 Condições mais adequadas.....	49

4.2.3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
4.2.3.9 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR).....	50
4.2.3.10 Difração de Raios X (DRX).....	51
4.2.3.11 Análise estatística.....	51
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.3.1 Avaliação subjetiva dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	52
4.3.2 Propriedades dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	53
4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
4.3.4 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR).....	80
4.3.5 Difração de Raios X (DXR).....	82
CAPÍTULO 5. APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO DE	
CORVINA (<i>Micropogonias furnieri</i>) E MMT.....	84
5.1 INTRODUÇÃO.....	85
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	87
5.2.1 Material.....	87
5.2.2 Preparo das amostras.....	87
5.2.3 Análises físicas, físico-químicas e microbiológicas.....	88
5.2.3.1 Perda de massa.....	88
5.2.3.2 Firmeza.....	89
5.2.3.3 Cor.....	89
5.2.3.4 Determinação de pH.....	89
5.2.3.5 Acidez titulável.....	89
5.2.3.6 Sólidos solúveis totais (°Brix).....	89
5.2.3.7 Análises microbiológicas.....	90
5.2.4 Análise estatística.....	90
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5.3.1 Perda massa.....	91
5.3.2 Firmeza.....	92
5.3.3 Cor.....	94
5.3.4 pH.....	96
5.3.5 Acidez titulável.....	97
5.3.6 Sólidos solúveis totais (°Brix).....	98
5.3.7 Análises microbiológicas.....	100

CONCLUSÕES.....	103
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
APÊNDICES.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>).....	9
Figura 2.2 Esquema da estrutura e fórmula química da montmorilonita.....	16
Figura 2.3 Representação esquemática de estruturas híbridas polímero/argila.....	18
Figura 3.1 Fluxograma de obtenção de isolado protéico de corvina por solubilização alcalina.....	31
Figura 4.1 Fluxograma de operações utilizado para desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina e MMT.....	44
Figura 4.2 Filme nanocompósito de IPC e MMT em teste de tração utilizando texturômetro TA.XTplus	46
Figura 4.3 Dispositivo para análise de perfuração.....	46
Figura 4.4 Esquema do sistema de determinação da deformação em teste de ruptura.....	47
Figura 4.5 Esquema da célula de difusão utilizada para determinar a permeabilidade ao vapor de água dos filmes biopoliméricos.....	48
Figura 4.6 Microscópio eletrônico de varredura.....	50
Figura 4.7 Difratorômetro de Raio X.....	51
Figura 4.8 Superfície de resposta da resistência à tração dos filmes nanocompósitos de IPC em função das concentrações de MMT (%) e glicerol (30g/100g de IPC).....	57
Figura 4.9 Superfície de resposta da elongação dos filmes nanocompósitos de IPC em função das concentrações de MMT (%) e IPC (%).....	60
Figura 4.10 Superfície de resposta da força na ruptura dos filmes nanocompósitos de IPC em função das concentrações de MMT (%) e IPC (%).....	65
Figura 4.11 Superfície de resposta da solubilidade dos filmes nanocompósitos de IPC em função das concentrações de glicerol e IPC.....	71
Figura 4.12 Superfície de resposta da permeabilidade ao vapor de água dos filmes nanocompósitos de IPC em função das concentrações de MMT (%) e IPC (%).....	74
Figura 4.13 (a) Fotomicrografia eletrônica de varredura do filme de isolado protéico puro plastificado com glicerol, mostrando a estrutura interna da matriz do filme. (b)	

correspondente ao filme nanocompósito de IPC mostrando a estrutura interna da matriz do filme.....78

Figura 4.14 Comparação dos espectros de filmes de IPC na faixa de número de onda de 4500 – 500 cm^{-1}80

Figura 4.15 Difratoograma de filme de isolado protéico.....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Composição proximal de CMS de corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>).....	34
Tabela 3.2 Composição proximal apresentada pelo isolado protéico de corvina	35
Tabela 3.3 Valores médios para capacidade de retenção de água (CRA) e solubilidade do IPC proveniente de CMS de corvina.....	36
Tabela 4.1 Variáveis utilizadas no planejamento experimental de Box e Behnken para desenvolvimento dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	43
Tabela 4.2 Resultados da avaliação subjetiva dos filmes nanocompósitos de IPC.....	52
Tabela 4.3 Delineamento experimental de Box e Behnken e resultados obtidos nos testes de tração e perfuração dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	54
Tabela 4.4 ANOVA do modelo de regressão para resistência à tração de filmes nanocompósitos de IPC.....	55
Tabela 4.5 Verificação da validade estatística do modelo para resistência à tração de filmes nanocompósitos de IPC.....	56
Tabela 4.6 ANOVA do modelo de regressão para alongação de filmes nanocompósitos de IPC.....	59
Tabela 4.7 Verificação da validade estatística do modelo para alongação de filmes nanocompósitos de IPC.....	59
Tabela 4.8 ANOVA do modelo de regressão para módulo de elasticidade de filmes nanocompósitos de IPC.....	61
Tabela 4.9 Verificação da validade estatística do modelo para módulo de elasticidade de filmes nanocompósitos de IPC.....	62
Tabela 4.10 ANOVA do modelo de regressão para força na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC.....	63
Tabela 4.11 Verificação da validade estatística do modelo para força na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC.....	64
Tabela 4.12 ANOVA do modelo de regressão para deformação na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC.....	65
Tabela 4.13 Verificação da validade estatística do modelo para deformação na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC.....	66

Tabela 4.14 Delineamento experimental de Box e Behnken e resultados de espessura, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e transparência dos filmes nanocompósitos de isolados protéicos de corvina.....	67
Tabela 4.15 ANOVA do modelo de regressão para umidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	68
Tabela 4.16 Verificação da validade estatística do modelo para umidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	68
Tabela 4.17 ANOVA do modelo de regressão para solubilidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	69
Tabela 4.18 Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	70
Tabela 4.19 ANOVA do modelo de regressão para permeabilidade ao vapor de água de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	72
Tabela 4.20 Verificação da validade estatística do modelo para permeabilidade ao vapor de água de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	73
Tabela 4.21 ANOVA do modelo de regressão para transparência de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	75
Tabela 4.22 Verificação da validade estatística do modelo para transparência de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	76
Tabela 5.1 Valores de perda de massa (%) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4±1°C.....	91
Tabela 5.2 Valores de firmeza (N) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4±1°C.....	93
Tabela 5.3 Valores de L*, Chroma a*, Chroma b* das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4±1°C.....	94
Tabela 5.4 Valores de pH das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4±1°C.....	96

Tabela 5.5 Valores de acidez titulável (g ácido cítrico/100 g) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	98
Tabela 5.6 Valores de sólidos solúveis totais das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	99
Tabela 5.7 Taxa de crescimento de micro-organismos psicrotróficos das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	100
Tabela 5.8 Taxa de crescimento de micro-organismos bolores e leveduras das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$	101
Tabela A.1 Delineamento experimental de Box e Behnken e resultados de espessura dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.....	132
Tabela A.2 Coeficientes de regressão para as diferentes respostas.....	133

RESUMO

O desenvolvimento de filmes e coberturas é um processo de transformação que utiliza polímeros capazes de formar uma matriz contínua. As proteínas de pescado apresentam propriedades que são vantajosas no preparo de biofilmes, como habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, apresentando boa barreira ao oxigênio, mas sua barreira ao vapor de água é baixa devido à sua natureza hidrofílica. Estas propriedades podem ser melhoradas aplicando nanotecnologia, incluindo materiais como as nanoargilas. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes nanocompósitos a partir de biopolímeros protéicos provenientes de isolados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) e argilas organofílicas. O isolado protéico de corvina (IPC) foi obtido utilizando processo de variação de pH para solubilizar e isolar proteína. Os filmes poliméricos foram desenvolvidos pela técnica de "casting". Para o desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina (IPC) e montmorilonita foi executado um planejamento experimental de 3 níveis e 3 fatores com 3 réplicas no ponto central. Os resultados foram submetidos à metodologia de superfície de resposta (MSR) para estudar os efeitos simultâneos das variáveis independentes, concentração de IPC (IPC = 2; 3,5 e 5 g/100 g de solução filmogênica); concentração de montmorilonita (MMT = 0,3; 0,5 e 0,7 g/100 g de solução filmogênica); e plastificante glicerol (G = 25, 30 e 35 g/100 g de IPC em base seca) sobre as respostas resistência à tração (MPa), alongação (%), força na ruptura (N), permeabilidade ao vapor de água ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{KPa}^{-1}$) e solubilidade (%). O isolado protéico obtido de carne mecanicamente separada de corvina apresentou 97,87% de proteína (em base seca), boa capacidade de retenção de água e solubilidade. Os valores de resistência à tração variaram entre 7,2 e 10,7 MPa e os valores de alongação de 39,6 a 45,8%. Os valores encontrados para PVA no presente trabalho encontram-se entre 3,2 e 5,5 $\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{KPa}^{-1}$. Os filmes nanocompósitos produzidos a partir de IPC e MMT foram promissores, do ponto de vista das propriedades mecânicas, aparência visual e fácil manuseio, bem como baixa permeabilidade ao vapor de água e a baixa solubilidade. Com relação às propriedades mecânicas, a concentração de IPC e MMT foi o principal fator que influenciou no desenvolvimento dos filmes nanocompósitos. O planejamento experimental utilizado determinou que 3,5 g de IPC; 0,5 g de MMT e 30 (g/100g de IPC) de glicerol seriam os parâmetros ideais para desenvolvimento de filmes nanocompósitos utilizando a técnica de "casting". As coberturas de isolado protéico de corvina (IPC) e as coberturas de IPC e MMT foram aplicadas em mamão minimamente processado para avaliar sua vida-útil. O revestimento com cobertura de isolado protéico de corvina e montmorilonita aplicado em mamão minimamente processado apresentou menor perda de massa 5,26%, menor crescimento microbiano e menor diminuição de firmeza, luminosidade e pH conseqüentemente apresentou os melhores resultados na cobertura de mamão minimamente processado, quando comparados com a amostra controle sem cobertura.

Palavras-chave: Isolado protéico, pescado, nanoargilas, nanocompósitos, filmes, avaliação.

ABSTRACT

The development of films and coatings is a transformation process that uses polymers capable to form a solid matrix. The fish proteins have properties that are advantageous in the preparation of biofilms, such as the ability to form networks, plasticity and elasticity, with a good oxygen barrier, but the barrier to water vapor is low due to its hydrophilic nature. These properties can be improved by applying nanotechnology, including materials such as nanoclays. The objective of this study was to development nanocomposite films from protein isolate of Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) and organoclays. The Whitemouth Croaker protein isolate (CPI) was obtained from mechanically separated meat using the pH shifting process to solubilize and isolate the protein. The polymer films were development by the technique of casting. CPI films was performed an experimental design of three levels and three factors with three replicates at the central point. The results were subjected to response surface methodology (RSM) to study the simultaneous effects of independent variables: CPI concentration (CPI = 2.0, 3.5 and 5.0 g/100 g film-forming solution), montmorillonite concentration (MMT = 0.3, 0.5 and 0.7 g/100 g film-forming solution) and plasticizer glycerol (G = 25, 30 and 35 g/100 g CPI on a dry basis) and the responses: tensile strength (MPa) , elongation (%), breaking strength (N), water vapor permeability ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) and solubility (%). The protein isolate obtained from mechanically recovered meat of croaker had 97.87% protein (dry basis), good water holding capacity and solubility. The values of tensile strength ranged between 7.2 and 10.7 MPa and elongation values of 39.6 to 45.8%. The values found for WVP in this study are between 3.2 and 5.5 $\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$. The nanocomposite films of CPI and MMT were promising from the stand point of mechanical properties, the visual appearance and easy handling, as well as low water vapor permeability and low solubility. In respect to mechanical properties, the concentration of CPI and MMT was the main factor that influenced the development of nanocomposite films. The experimental design used determined that CPI 3.5 g, 0.5 g of MMT and glycerol 30 (g/100 g CPI) would be the ideal parameters for development of nanocomposite films using the technique of casting. The CPI coating with and without MMT were applied in minimally processed papaya as covering to evaluate their shelf-life. The coating of Whitemouth Croaker protein isolate and montmorillonite used in minimally processed papaya showed lower mass loss, growth and microbial reduction of firmness, pH and therefore light showed the best results in coverage of papaya minimally processed, when compared with control samples without covering.

Keywords: Protein isolate, fish, nanoclays, nanocomposite, films, evaluation.

A redação do presente trabalho foi dividida em capítulos, detalhados a seguir:

CAPITULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS. Neste capítulo faz-se uma introdução do trabalho de pesquisa, e os objetivos alcançados.

CAPITULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. Neste capítulo apresenta-se uma descrição da matéria-prima, das características do isolado protéico de pescado, da montmorilonita e algumas generalidades sobre a obtenção de biofilmes.

CAPITULO 3. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*). Este capítulo trata da obtenção e caracterização do isolado protéico de corvina (IPC) obtido da carne mecanicamente separada de corvina através do processo de variação de pH para solubilizar e isolar proteína. As características do isolado protéico de corvina foram avaliadas através das análises de composição proximal e propriedades funcionais de capacidade de retenção de água e solubilidade.

CAPITULO 4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) E ARGILA ORGANOFILICA. Neste capítulo trata do desenvolvimento dos filmes de IPC e discutem-se os resultados obtidos nos filmes obtidos por um planejamento experimental de 3 níveis e 3 fatores com 3 réplicas no ponto central, sugerido por Box e Behnken (1960). As variáveis independentes, concentração de IPC, concentração de montmorilonita (MMT), e plastificante glicerol. A influência destas variáveis foi avaliada, em função das propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação, módulo de elasticidade, força na ruptura e deformação na ruptura), da solubilidade em água do filme, propriedades ópticas (transparência), de barreira (permeabilidade ao vapor de água), microscopia eletrônica de varredura, análises estruturais em espectroscopia de infravermelho (FTIR) e difração de raios-X.

CAPITULO 5. APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) E MONTMORILONITA. Neste capítulo trata da aplicação dos revestimentos nanocompósitos de isolado protéico de corvina e glicerol e revestimentos nanocompósitos de isolado protéico de corvina e montmorilonita como cobertura em mamão minimamente processado e avaliar a vida-útil do mamão através de análises físico-químicas, firmeza, cor e microbiológica.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são filmes plásticos biodegradáveis obtidos a partir de materiais biológicos, que agem como barreira a elementos externos, e podem proteger os produtos embalados de danos físicos e biológicos, assim como impedirem a volatilização de compostos e a perda de umidade, aumentando a vida útil do produto. Nos últimos anos tem sido verificado o grande interesse pelo desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, devido às preocupações ambientais sobre o descarte dos materiais não renováveis das embalagens para alimentos e às oportunidades para criar novos mercados para as matérias-primas formadoras de filme (PAIVA et al., 2006; RHIM e NG, 2007; BAE et al., 2009).

A elaboração de biofilmes é um processo de transformação que utiliza biopolímeros (BP) capazes de formar uma matriz contínua (GONTARD e GUILBERT, 1996). As características desta matriz dependerão das propriedades físico-químicas e estruturais das macromoléculas formadoras de filme, dentre as quais se destacam as proteínas e amidos. As combinações destes biopolímeros adicionados de agentes plastificantes e lipídios têm sido muito empregadas na área de desenvolvimento de biomateriais.

As proteínas de peixe apresentam propriedades que são vantajosas no preparo de biofilmes, como habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, apresentando boa barreira ao oxigênio, mas sua barreira ao vapor de água não é eficiente devido à sua natureza hidrofílica. Estas propriedades podem ser melhoradas aplicando nanotecnologia, incluindo materiais como as nanoargilas, argilas organofílicas. Assim, estas partículas de tamanho nanométrico, dispersas na matriz polimérica poderiam melhorar as propriedades mecânicas, de barreira a gases e à umidade, térmicas, ópticas (transparência), quando comparadas com compostos poliméricos convencionais (PAIVA et al., 2006).

Os biopolímeros naturais apresentam vantagens sobre os polímeros sintéticos, pois estes são biodegradáveis e renováveis. Entretanto, as propriedades relativamente baixas da barreira mecânica e de vapor de água desses filmes são as principais limitações para seu uso industrial. Os esforços de pesquisa foram centrados sobre a modificação das propriedades baseadas em filmes naturais de biopolímeros para melhorar suas propriedades de barreira mecânica e de vapor de água (RHIM e WELLER, 2000; RHIM, 2004).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver filmes nanocompósitos a partir de isolado protéico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e argila organofílica.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obter isolado protéico utilizando como matéria-prima a corvina, um pescado de baixo valor comercial;
- Avaliar as características do isolado protéico processado a partir da corvina;
- Desenvolver e caracterizar os filmes de isolado protéico de corvina (IPC) e argila organofílica, relacionando os parâmetros independentes como concentração de isolado protéico de corvina, concentração de plastificante e concentração da argila montmorilonita (MMT) com as propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação, módulo de elasticidade, força na ruptura e deformação na ruptura), permeabilidade ao vapor de água, transparência e solubilidade através do uso de um planejamento experimental;
- Caracterizar os filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina e montmorilonita pela técnica de difração de Raios-X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho;
- Aplicar os filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina e montmorilonita como revestimento em mamão minimamente processado.

O desenvolvimento e caracterização dos filmes de isolado protéico de corvina foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) e na Unidade de Processamento de Pescado (UPP) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como em outros laboratórios da FURG localizados no Campus Cidade e no Campus Carreiros. As análises de difração de Raios-X, microscopia eletrônica de varredura, foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo faz uma descrição geral da matéria-prima, do isolado protéico de pescado, montmorilonita, técnicas de elaboração de filmes de diferentes compostos e caracterização dos filmes.

2.1 PESCADO

O pescado é, desde a antiguidade, uma importante fonte de alimentos e a pesca uma atividade econômica promotora de benefícios sociais para as populações humanas em todo o mundo. Possui também todos os aminoácidos essenciais ao crescimento e à manutenção do organismo humano, aliado à presença de elementos minerais necessários às inúmeras funções orgânicas do organismo (FARIAS, 2006).

O pescado é conhecido por ser uma fonte de proteína rica em aminoácidos essenciais (lisina, metionina, cistina, treonina e triptofano), micro e macro elementos (cálcio, fósforo, flúor, iodo), e gorduras que são fontes valiosas de energia, vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos insaturados que, entre outras vantagens, tem um efeito hipocolesterolêmico (FERNANDEZ e VENKATRAMMANN, 1993; USYDUS et al., 2009).

Segundo Taskaya et al., (2009) a capacidade dos recursos naturais aquáticos para fornecimento de produtos alimentares foi atingido, e futuras demandas para estes alimentos terão de ser preenchidas pela aquicultura e mais eficiente utilização do processamento de subprodutos. Espécies de pescado de baixo valor comercial vêm sendo amplamente estudadas com a finalidade de transformar essa matéria-prima em produtos aceitáveis pela população, conduzindo a um maior consumo (CENTENARO, 2007).

2.1.1 Composição do pescado

A composição química do pescado varia de espécie para espécie e de indivíduo para indivíduo dependendo de fatores, tais como, sexo, idade, ambiente e estações do ano. O conhecimento da composição do pescado tem importância fundamental na aplicação de diferentes processos tecnológicos, influenciando no

aspecto de qualidade da matéria-prima, bem como nos atributos sensoriais e na estabilidade do armazenamento do produto (YEANNES e ALMANDOS, 2003).

O músculo do pescado pode conter 60 a 85% de umidade, 20% de proteína bruta, 1 a 2% de cinzas, 0,3 a 1% de carboidratos e 0,6 a 36% de lipídeos (OGAWA e MAIA, 1999). A carne de pescado se equivale em média à carne de mamíferos e aves, em termos de proteínas, porém as de pescado apresentam digestibilidade de 90 a 100%, valores que são ligeiramente superiores que a da carne bovina e de frango (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

Morfologicamente, o pescado é composto de músculo ordinário (branco) e sanguíneo (escuro). Bioquimicamente sabe-se que o músculo escuro tem maior proporção de proteína sarcoplasmática e de estroma que o músculo ordinário, que o conteúdo de glicogênio é mais alto em carnes sanguíneas, e por isso, no rigor mortis o pH atinge valores mais baixos (músculo escuro pH 5,6 a 6,0; músculo branco pH 6,0 a 6,4), que o músculo escuro é mais rico em lipídeos, taurina (aminoácido sulfônico) e ferro (OGAWA e MAIA, 1999).

2.1.2 Proteínas do pescado

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente de alta sensibilidade à hidrólise e composição balanceada em aminoácidos, principalmente os limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (NEVES et al., 2004).

A proteína muscular é constituída de proteína sarcoplasmática, proteína miofibrilar e proteínas do estroma-proteína do tecido conectivo. Estas três frações de proteínas podem ser diferenciadas pela sua solubilidade (BANDMAN, 1987).

Os principais componentes das proteínas estruturais são: actomiosina, tropomiosina, miosina e actina. Sendo a actina e a miosina as proteínas de maior importância principalmente pelas suas propriedades funcionais. A miosina é responsável por uma série dessas propriedades como: a gelificação, retenção de água e de emulsificação (RAGHAVAN e KRISTINSSON, 2008).

As proteínas miofibrilares, que representam 66 - 77% das proteínas totais têm um papel fundamental na coagulação e formação de gel, quando se processa o músculo de pescado. Estas formam as miofibrilas, e conferem às células musculares sua propriedade contráctil, influenciando tecnologicamente nas qualidades culinárias e comerciais das carnes, pois são responsáveis pela capacidade de retenção de água, propriedades emulsificantes e também pela brandura da carne, contendo ainda quantidades importantes de aminoácidos essenciais, contribuindo assim em mais de 70% do suporte protéico devido ao consumo de carne. Músculos brancos de pescado contêm menos proteínas miofibrilares do que os vermelhos (SIKORSKI e SUN, 1994; KUHN e SOARES, 2002).

As proteínas sacorplasmáticas constituem cerca de 35% das proteínas totais do músculo, são solúveis em água independente da força iônica. Este aspecto permite a solubilidade da proteína facilitando a interação dos seus sítios ativos nas proteínas solúveis do que as proteínas insolúveis em água (REN et al., 2008).

2.1.3 Corvina (*Micropogonias furnieri*)

A corvina (*Micropogonias furnieri*) é um dos peixes demersais e bentônicos sciaenídeos com distribuição conhecida desde o Golfo do México, Antilhas até o Golfo de San Matías, Argentina. No ciclo de vida de *Micropogonias furnieri*, os indivíduos juvenis migram para áreas estuarinas e os adultos alcançam a zona costeira adjacente para reproduzir (VAZZOLER, 1991). Esta espécie é chamada de demersais e bentônicos porque é encontrada em fundos lodosos e arenosos, mais comumente em profundidades inferiores a 60 metros (MENEZES e FIGUEIREDO, 1980; PORTO et al., 2009). Possui grande tolerância às variações de salinidade, o que facilita a alimentação e melhores condições para proteger-se de predadores (CASTELLO, 1986). É um pescado onívoro e prefere uma dieta baseada em pequenos crustáceos como caranguejos e camarões (COSTA e ARAÚJO, 2003).

A corvina é considerada um dos mais importantes recursos costeiros da plataforma Sul do Brasil. Em 2008 o desembarque no estado de Rio Grande do Sul foi de 6.680.582 kg, o custo de comercialização desta espécie é de R\$ 0,75 por Kg (IBAMA/CEPERG, 2009). De acordo com Elsdon e Gillanders (2002), a corvina pode atingir até 70 cm de comprimento, porém é permitida a captura de exemplares com no

mínimo 25 cm (BRASIL, 2003). Sendo uma espécie muito comum na zona costeira do sul do Brasil. No entanto, apesar da grande disponibilidade desta matéria-prima, esta espécie atinge no mercado menores preços (principalmente as espécies adultas por serem parasitadas) em relação a outras espécies regionais, principalmente as de menor tamanho.

A composição proximal da corvina varia em função das estações do ano, estas variações também podem ocorrer devido a fatores como sexo, tamanho, ciclo reprodutor e alimentação (BADOLATO et al., 1994; CENTENARO, 2007). Bonacina e Queiroz (2007), avaliando a composição química da corvina encontraram valores médios de 78,50 % de umidade, 18,80% de proteína, cinzas 1,20% e lipídeos 1,10%.

Na Figura 2.1 é apresentado um exemplar de corvina (*Micropogonias furnieri*).



Figura 2.1 Corvina (*Micropogonias furnieri*)

2.1.4 Isolado protéico de pescado

Isolamento de proteína é basicamente um processo de extração o qual visa obter um produto livre de interferentes. Isolados e hidrolisados protéicos de pescado, geralmente são obtidos por solubilização química, ácida ou alcalina, ou por via enzimática, respectivamente, a partir de resíduos ou de pescado inteiro. Estes podem ser utilizados como ingredientes funcionais em uma ampla e sempre crescente faixa de aplicação em diversos alimentos e em outros produtos (MARTINS, 2009).

As proteínas do músculo de pescado podem ser isoladas por solubilização em pH extremos. A proteína pode ser precipitada no ponto isoelétrico, que rende uma

suspensão heterogênea, com um teor de proteína próximo a 200 g/L (BRENNER et al., 2009).

Uma característica importante dos processos por solubilização ácida ou alcalina, é que quando o músculo protéico é submetido a valores extremos de pH, as proteínas são parcialmente desdobradas. Este desdobramento parcial leva a mudanças substanciais na parte estrutural e conformacional das proteínas, as quais conduzem a diferentes propriedades quando são recuperadas (KRISTINSSON e HULTIN, 2003).

A produção de proteína obtida durante o processo por mudança de pH (conhecido como *pH shifting process*) é determinada por três fatores principais, a solubilidade das proteínas em condições extremas de pH, o tamanho do sedimento insolúvel formado durante o processo de centrifugação e a solubilidade das proteínas ao pH selecionado para a precipitação (NOLSOE e UNDELAND, 2009).

Uma primeira etapa consiste na homogeneização dos tecidos do pescado, para produção de isolado protéico, utiliza-se uma parte da carne triturada do pescado com 6 a 9 partes de água (NOLSOE e UNDELAND, 2009). O principal fator nesta etapa é a alta solubilidade das proteínas musculares e baixa viscosidade do homogeneizado para recuperar o máximo de proteínas possível, e a baixa viscosidade, é necessário para separar as proteínas solúveis das insolúveis e os lipídios por centrifugação (KRISTINSSON e INGADOTTIR, 2006).

Bechtel et al., (2005) investigaram as possibilidades de usar o processo alcalino na produção de isolados protéicos solúveis e insolúveis a partir de vísceras de salmão rosa e cabeças de salmão vermelho. Após liofilizar os isolados, o conteúdo protéico foi analisado, obtendo o seguinte resultado: fração insolúvel das cabeças do salmão vermelho (50,7%), fração insolúvel das vísceras do salmão rosa (69,4%), fração solúvel do salmão vermelho (90%) e fração solúvel das vísceras do salmão rosa (87,2%).

Sathivel (2003) propôs um procedimento para obtenção de um isolado protéico de pescado, através de um método de extração química alcalina com precipitação isoelétrica. Neste processo foi utilizado aquecimento a 85 °C por 60 minutos e foi verificado que as propriedades funcionais do isolado protéico foram semelhantes a da proteína padrão albumina. Em um estudo realizado por Takeiti (2002) foi verificado a

influência do tratamento térmico nas propriedades de isolados protéicos de soja, indicaram que temperaturas acima de 60 °C são desaconselháveis no processo, pois há desnaturação protéica.

Kristinsson (2003) utilizou um processo semelhante para obtenção de isolado protéico de pescado através de um processo alcalino, utilizando aumento de pH entre 10,5 e 11,5 para extração protéica e após redução de pH até 4,5 para precipitação isoelétrica das proteínas. O mesmo autor realizou um estudo para obtenção de isolado protéico de pescado utilizando um processo ácido, no qual a matéria-prima foi submetida primeiro a redução de pH até 2 e após aumento de pH até 4,5 no ponto isoelétrico das proteínas.

Chen e Jaczynski (2007) aplicaram os métodos, ácido e alcalino, no processamento de resíduo de trutas (ossos, cabeça, pele, etc.) usando duas centrifugações contínuas. O conteúdo protéico encontrado variou de 77,7 a 89%, dependendo do pH utilizado para a solubilização e precipitação.

Taskaya et al., (2009) relataram dois processos de solubilização da proteína: a ácida ou a alcalina, onde envolve mudar o pH do tecido muscular a pH 2-3 ou pH 11,5 -12,5, que solubiliza proteínas musculares, e Park (2009), mostrou que o processo de obtenção de isolados consiste na homogeneização do tecido do pescado a pH menor que 3,0 e maior que 10 utilizando 1-2 N de NaOH e 1-2 N de HCl. Rawdkuen et al., (2009) ajustou os valores de pH utilizando Na₂CO₃ 2 N e HCl 2 N, para recuperação das proteínas do músculo de tilápia. Já Brenner et al., (2009) solubilizaram proteínas do músculo de bacalhau em pH alcalino, entre 10,5 e 12,0 utilizando NaOH 0,15 - 0,25 N.

Yongsawatdigul e Park (2004) realizaram experimentos de solubilização ácida e alcalina das proteínas de músculos de pescado, utilizando HCl e NaOH como agentes acidificante e alcalinizante, respectivamente. Os maiores percentuais de solubilidade (aproximadamente 60%) foram obtidos nos valores de pH 2 a 3 e nos valores de pH 11 a 12, e valores mínimos de solubilidade no pH 5. Similares resultados, também com pescado, foram obtidos por Choi e Park (2002), que encontraram valores de máxima solubilidade nos valores de pH 2 e 11 e mínima solubilidade no pH 5.

Em um estudo preliminar de isolamento de proteína utilizando os processos, ácido e alcalino, com arenque inteiro e vísceras, Rokaeus e Undeland (2007) informaram que o conteúdo de proteína total para o pescado inteiro variou entre 60 e 65%, e para as vísceras foram encontrados valores inferiores. Para os isolados protéicos, o processo ácido resultou em valores de 59 e 54% quando utilizado intestino do arenque inteiro. Para o processo alcalino, os valores correspondentes foram 58 e 55%, respectivamente.

2.2 PRODUÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS

O desenvolvimento de tecnologia de biomateriais, aplicáveis aos vários setores industriais, na área de embalagens, ganharam atenção especial em relação à questão da preservação do ambiente. Sabe-se que as embalagens plásticas garantem proteção aos diferentes produtos alimentícios; mas também são as maiores responsáveis pela contaminação por acúmulo no meio ambiente, uma vez que seu processo de degradação é difícil ou demorado (GONTARD et al., 1992). As alternativas encontradas para minimizar o efeito negativo dos resíduos gerados pelas embalagens deste tipo vão desde a reciclagem, até a substituição parcial ou total dos materiais sintéticos por biomateriais (GARCÍA et al., 2000).

Nas últimas duas décadas, o descarte e o acúmulo de embalagens não biodegradáveis ou com biodegradação muito lenta, como as embalagens plásticas, tem causado problemas ambientais. Uma das soluções encontradas, particularmente na área de embalagens de alimentos, é o desenvolvimento de filmes a partir de biopolímeros que possam substituir os materiais sintéticos. Dentre os materiais pesquisados, os biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, se apresentam mais promissores, em razão de serem abundantes, renováveis, de baixo custo e capazes de formar uma matriz contínua (RHIM e NG, 2007).

Os biofilmes são filmes plásticos biodegradáveis obtidos a partir de materiais biológicos, que agem como barreira a elementos externos, e podem proteger os produtos embalados de danos físicos e biológicos, assim como impedirem a volatilização de compostos e a perda de umidade, aumentando a vida-útil do produto. Nos últimos anos tem sido verificado o grande interesse pelo desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, devido às preocupações

ambientais sobre o descarte dos materiais não renováveis das embalagens para alimentos e às oportunidades para criar novos mercados para as matérias-primas formadoras de filme (PAIVA et al., 2006; RHIM e NG, 2007; BAE et al., 2009).

O desenvolvimento e a caracterização de filmes biopoliméricos e/ou biodegradáveis têm sido muito estudados devido ao seu potencial para uso como embalagens, e também pela questão da biodegradabilidade. Nos últimos anos observa-se um número expressivo de publicações em filmes biopoliméricos e suas caracterizações (DENAUI et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; MARCUZZO et al., 2010; ABUGOCH et al., 2011; PEREDA et al., 2011; MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011; HENDRIX et al., 2012; MOHAN et al., 2012; BONILLA et al., 2012; AL-HASSAN e NORZIAH, 2012).

Além da possibilidade de retornarem ao ciclo biológico depois do uso, os filmes biopoliméricos podem ser desenvolvidos a fim de se obter propriedades que satisfaçam as aplicações requeridas, tais como barreira à transferência de massa (vapor de água e gases), transporte de aditivos alimentares (pigmentos, aromas, flavorizantes) e liberação controlada de substâncias ativas (antioxidantes e agentes antimicóticos) (PERESSINI et al., 2003).

2.2.1 Obtenção de filmes biodegradáveis pelo método de “*casting*”

A técnica de *casting* para a obtenção de biofilmes, amplamente difundida, consiste na desidratação de uma solução filmogênica (SF), aplicada de maneira conveniente sobre um suporte. Definindo-se “conveniente” ao volume/massa aplicado da solução filmogênica, com a finalidade de se obter uma espessura determinada e ao tipo de material de suporte, de área conhecida, utilizado para facilitar a retirada do filme após a sua secagem (MONTERREY-QUINTERO, 1998; SAKANAKA, 2002; VICENTINI, 2003; ARAUJO-FARRO, 2008).

2.2.1.1 Plastificantes

Os plastificantes são substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade. Quando adicionados a outro material provocam mudanças nas propriedades físicas,

químicas e mecânicas dos mesmos. Os plastificantes mais utilizados na elaboração de biofilmes a partir de proteínas ou polissacarídeos são os polióis como glicerol, sorbitol ou uma mistura destes nas blendas das soluções filmogênicas (GENNADIOS et al., 1994).

Os plastificantes são moléculas pequenas que ocupam posições entre as cadeias dos polímeros aumentando a distância entre elas, com a redução das forças intermoleculares o que ocasiona um aumento da flexibilidade e da plasticidade dos filmes quando comparados aos filmes de polímeros puros (CALLISTER, 2002; CHANG et al., 2006). Como os plastificantes reduzem as interações intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias dos polímeros, há uma diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças, resultando assim em materiais com menores temperaturas de transição vítrea (T_g), menor cristalinidade, menor rigidez, maior flexibilidade e melhor maquinabilidade (VAN SOEST et al., 1996; MÜLLER, 2007; MALI et al., 2006).

Entre os plastificantes compatíveis com água estão a glicose, sacarose, xilol, sorbitol e glicerol, que tem efeito plastificante sobre as propriedades de materiais poliméricos com alta temperatura de transição vítrea, especialmente filmes a base de biopolímeros (CHANG et al., 2006).

Outros componentes utilizados, também considerados por apresentar efeito plastificante são os lipídios. Estes materiais quando adicionados nas soluções filmogênicas de filmes e coberturas atuam como estabilizantes de emulsões, modificadores de processo de cristalização, veículo de aromas, lubrificantes entre as cadeias poliméricas, agentes de relaxação e como reforçador de brilho (ARAUJO-FARRO, 2008).

2.2.1.2 Compósitos

O termo compósito refere-se a materiais heterogêneos, multifásicos, podendo ser ou não poliméricos, em que pelo menos um dos componentes é descontínuo, oferecendo geralmente a principal resistência ao esforço (componente estrutural ou reforço) e em que outro componente é contínuo e representa o meio de transferência desse esforço (componente matricial ou matriz). Esses componentes não se dissolvem

nem se descaracterizam completamente; apesar disso, atuam de forma sinérgica, isto é, as propriedades do conjunto são superiores às de cada componente individual, para uma dada aplicação (MANO e MENDES, 1999).

2.2.1.3 Nanocompósitos

O prefixo nano, do grego *nánnos*, designa entes diminutos, ou muito pequenos. Convenientemente, na química dos polímeros, são denominados nanocompósitos os sistemas poliméricos reforçados com partículas inorgânicas cuja dimensão relevante é da ordem do nanômetro, um bilhão de vezes menor que o metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). A família de minerais silicatos aluminosos hidratados, popularmente conhecidos por argila, revelou-se boa fonte de reforços para nanocompósitos. Entre esses minerais, a montmorilonita (ou MMT), cujo esquema pode ser observado na Figura 2.2, é o mais comumente empregado. A estrutura do material compõe-se de um sanduíche de camadas de sílica tetraédrica, com recheio de alumínio octaédrico, em que cada camada possui espessura de no máximo 10 nm. Diferente das argilas comumente utilizadas como reforços de plásticos, como a mica e o talco, a montmorilonita pode ser delaminada e incorporada na resina em camadas individuais com espessuras da ordem de 1 nm, formando os nanocompósitos.

Os nanocompósitos resultantes, por apresentarem carga elétrica positiva com uma elevada área superficial por unidade de volume, freqüentemente exibem propriedades superiores quando comparados aos polímeros virgens e aos micro ou macro-compósitos convencionais correspondentes. O aumento do módulo, da resistência à tração e ao calor, bem como a melhoria nas propriedades de barreira e do retardamento da chama tem sido relatado por inúmeros pesquisadores (BUTZIOFF e D'SOUZA, 2000; RAY et al., 2003; PEGORETTI et al., 2004). A estrutura dos nanocompósitos de matriz polimérica depende da natureza dos constituintes utilizados tais como: tipo de polímero, tipo de argila, e modificante orgânico da mesma, bem como do método de preparação empregado.

O termo compósito descreve um material de duas fases em que uma das fases está dispersa na segunda, no caso de nanocompósitos, dispersa em nível nanométrico (10^{-9} m) (GARCIA, 2003). Igualmente, os biocompósitos consistem em uma matriz

polimérica e uma fase dispersa onde ambos constituintes são biodegradáveis (AVEROUS e BOQUILLON, 2004).

Em alguns compósitos, denominados nanocompósitos, a fase dispersa é constituída por argilominerais, filossilicatos hidratados dispostos em camadas sobrepostas na proporção 1:2 (RAY e OKAMOTO, 2003). Os filossilicatos mais freqüentemente utilizados em nanocompósitos pertencem à família das esmectitas, como por exemplo, as montmorilonitas (MMT), hectoritas e saponitas, sendo a MMT predominante entre elas. A morfologia do argilomineral consiste em uma estrutura cristalina de duas folhas tetraédricas de sílica (SiAl) e uma folha central de hidroxilas em disposição octaédrica ($Mg(OH)_2$ ou $Al(OH)_3$), dispostos em camada e unidas pelos oxigênios comuns as folhas (Figura 2.2).

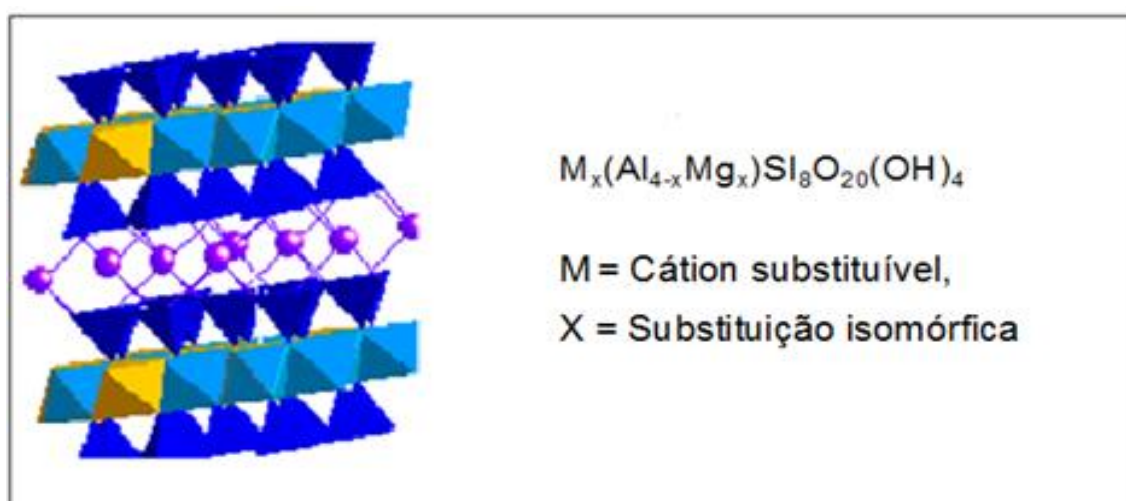


Figura 2.2 Esquema da estrutura e fórmula química da montmorilonita. Os octaedros amarelos representam Mg^{2+} substituindo Al^{3+} . Os cátions Ca^{2+} e Na^+ (esferas lilás) encontram-se entre as folhas do tipo 2:1.

Fonte: Bizarria, 2007.

Os nanocompósitos de polímero-argila são uma classe de materiais híbridos compostos de materiais de polímeros orgânicos e enchimentos em nano-escala da argila (GIANNELIS, 1996; LAGALY, 1999). A montmorilonita (MMT), a hecrite e a saponita são freqüentemente os silicatos novos adicionados usados, que são combinados com os materiais poliméricos para dar forma a nanocompósitos (RAY e OKAMOTO, 2003).

De um lado, os materiais do polímero nanocompósito, tendo componentes com dimensões na escala do nanômetro, são tópicos da pesquisa intensa na área de polímeros, ciência material, eletrônica e ciência biomédica (RAY e OKAMOTO, 2003).

Um polímero nanocompósito é o material híbrido que consiste em uma matriz do polímero reforçada com uma fibra, uma plaqueta, ou uma partícula que tem uma dimensão na escala do nanômetro (PANDEY et al., 2005). Devido ao tamanho do nanômetro as partículas se dispersam na matriz do polímero, estes nanocompósitos exibem marcadamente melhorias das propriedades mecânicas, térmicas, óticas e físico-químicas quando comparadas com o polímero puro ou os compósitos (microscópicos) convencionais.

As argilas, para serem organofílicas, são modificadas com substâncias orgânicas que apresentam afinidade química com sua estrutura cristalina e tornando-se hidrofóbicas (PAIVA et al., 2008). A montmorilonita é um mineral argiloso originário da erosão de cinza vulcânica que por ser polar, não é compatível com a maioria dos polímeros que são menos polares ou apolares e, portanto, deve ser modificada. Para tanto, são utilizados agentes compatibilizantes que se ligam à superfície da montmorilonita e que vão interagir com a resina para formar um sistema miscível, sendo esta compatibilização um dos maiores desafios para utilização de nanocompósitos (GARCIA, 2003; PANDEY et al., 2005; CARASTAN, 2007).

As lamelas de MMT têm espessura inferior ao comprimento de onda da luz visível, e logo, se adequadamente orientadas, não desviam ou refletem a luz, sendo transparente que é uma característica desejável em aplicações na área de embalagem. Além disto, as lamelas da MMT são resistentes a solventes, às temperaturas de polimerização e de extrusão e ao atrito da extrusão, vantagens importantes nos processos de transformação. Por outro lado, o efeito de redução da permeabilidade é principalmente atribuído à elevada relação de superfície/massa das lamelas que aumentam a tortuosidade dos caminhos na difusão dos gases através do nanocompósito (GARCIA, 2003; CHIOU et al., 2005).

Nos compósitos, quando as lamelas de filossilicatos são distribuídas e dispersas de forma agregada clássica, são denominados microcompósitos ou compósitos convencionais. No caso de uma ou mais cadeias do polímero interagir com os silicatos, gerando um compósito de morfologia multicamada ordenada, este é chamado de nanocompósito intercalado. Se as camadas de silicato, imersas na matriz

polimérica estiverem completamente dispersas, sua morfologia é chamada de nanocompósito esfoliada (Figura 2.3) (RAY e OKAMOTO, 2003; PANDEY et al., 2005; CAUVIN et al., 2007).

As configurações apresentadas na Figura 2.3 são uma representação simplificada dos três tipos de estrutura possíveis de ser adquiridos por estes materiais:

- **Estrutura com fases separadas:** compósitos de polímero/silicato nos quais o polímero e o material inorgânico utilizado como reforço permanecem imiscíveis, não havendo intercalação das cadeias poliméricas nas camadas de argila resultando, portanto, em compósitos convencionais.
- **Estrutura intercalada:** ocorre como resultado da penetração do polímero por entre as camadas de argila, sendo que uma ou algumas cadeias de polímero são intercaladas entre duas camadas da argila. Isso resulta em aumento da distância entre as mesmas, formando uma estrutura multicamada bem ordenada com alternância das cadeias de polímero e as camadas de argila em repetidas distâncias de alguns nanômetros (1-4 nm).
- **Estrutura delaminada ou esfoliada:** formada quando as camadas do silicato (de espessura de um nanômetro) são esfoliadas e uniformemente dispersadas em uma matriz polimérica contínua.

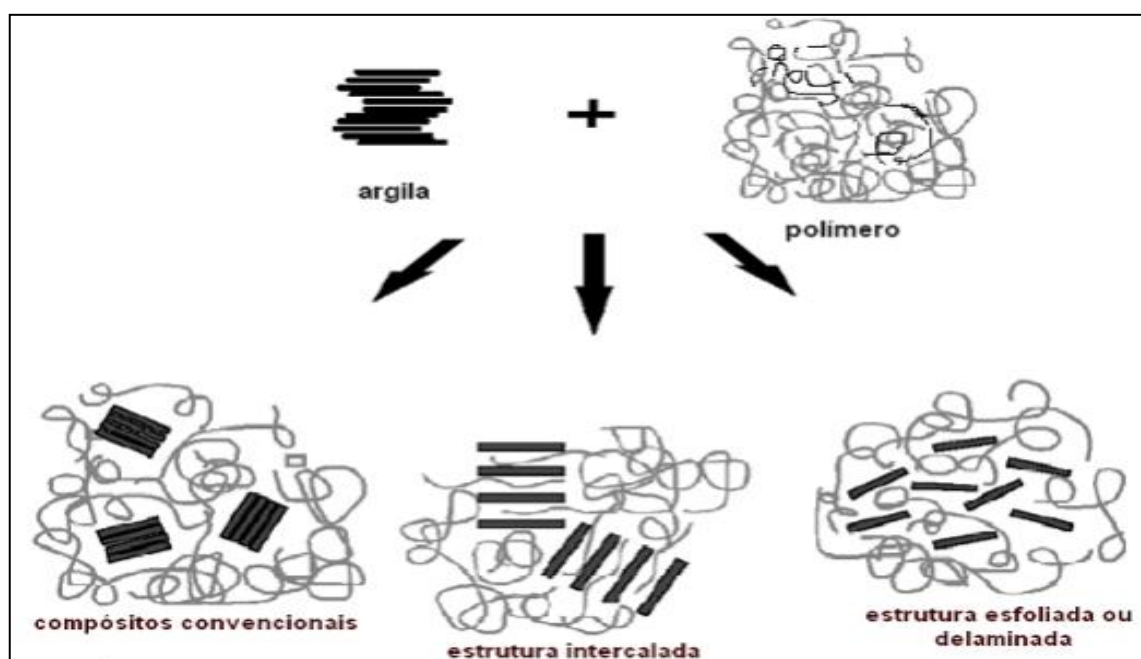


Figura 2.3 Representação esquemática de estruturas híbridas polímero/argila.

Fonte: Bizarria, 2007.

2.2.2 Filmes de proteína

As proteínas de pescado apresentam propriedades que são vantajosas no preparo de biofilmes, como habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, apresentando boa barreira ao oxigênio, mas sua barreira ao vapor de água é baixa devido à sua natureza hidrofílica. Estas propriedades podem ser melhoradas aplicando nanotecnologia, incluindo materiais como as nanoargilas, argilas organofílicas. Assim, estas partículas de tamanho nanométrico, dispersas na matriz polimérica poderiam melhorar as propriedades mecânicas, de barreira a gases e à umidade, térmicas, ópticas e transparência, quando comparadas com compostos poliméricos convencionais (PAIVA et al., 2006).

Cuq et al. (1995), trabalhando com proteínas de sardinha (*Sardina pilchardus*), demonstraram que as proteínas miofibrilares possuem a capacidade de formar filmes transparentes e bastante resistentes. Outros trabalhos foram realizados com proteínas miofibrilares de carne bovina (SOUZA et al., 2004) e de pescado (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000). Nesses estudos são evidenciadas as características promissoras desses materiais e a necessidade de mais pesquisas para melhor desenvolvimento dos filmes.

Chambi e Grosso (2006) utilizaram diferentes blendas de caseína-gelatina em diferentes proporções (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100) reticuladas com a enzima transglutaminase para a elaboração de filmes. As blendas apresentaram um efeito sinérgico observado na alongação, nos testes de tração, com ou sem a ação da transglutaminase. Por outro lado não foram observadas nenhuma mudança em relação às propriedades de tensão na tração e de barreira ao vapor de água, com a exceção da formulação (75:25) com transglutaminase, que mostrou valores baixos de permeabilidade ao vapor de água ($5,06 \pm 0,31$ g mm /m² dia KPa).

Aplicações de embalagens em alimentos, à base de filmes protéicos podem atuar como barreiras para a transferência de oxigênio, dióxido de carbono, óleos, gorduras e compostos voláteis, evitando assim perda de qualidade e aumentando a vida-útil de produtos alimentícios. Uma grande vantagem desses filmes é que eles podem ser usados como veículos de aditivos, como antioxidantes e agentes antimicrobianos, vitaminas, aromas e corantes, assim agindo como composto liberador de embalagens que ajudam a melhorar a qualidade e preservação de alimentos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2009; HAN e KROCHTA, 2007).

Concentrado protéico de soro tem excelentes propriedades nutricionais e funcionais além da sua capacidade de formar filmes (PÉREZ-GAGO et al., 2003). Embora as proteínas do soro sejam comercializadas como soro de leite concentrados e isolados, na maior parte da literatura revisada o concentrado protéico de soro é pouco utilizado para a fabricação de filmes comestíveis (SOAZO et al., 2011).

Filmes comestíveis obtidos a partir de proteínas de soro de leite termicamente desnaturadas com adição de um plastificante, como glicerol, tornam-se mais transparente, agradável e flexível. Estes filmes comestíveis tem excelentes propriedades de barreira ao oxigênio, aroma e baixa umidade relativa (PÉREZ-GAGO e KROCHTA, 2002).

Shellhammer e Krochta (1997) e Pérez-Gago e Krochta (2000) relataram que o tipo e a quantidade de lipídeos foram importantes no controle da permeabilidade ao vapor de água de filmes de emulsão de proteínas de soro de leite, mas também teve um efeito negativo sobre suas propriedades mecânicas. Conseqüentemente, os componentes de filmes comestíveis devem ser cuidadosamente selecionados de acordo com a aplicação final do filme comestível. Um filme comestível deve ser resistente para suportar a manipulação durante a sua aplicação e para manter sua integridade e também suas propriedades de barreira (TANADA-PALMU e GROSSO, 2005).

A formação de filmes de proteínas de soja tem sido descrito como um processo de duas etapas que envolvem a desnaturação das proteínas por calor seguido de desidratação da superfície. Após a secagem, a ligação de proteínas desdobradas através de interações intermoleculares, tais como pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas, levam à formação de uma rede (GENNADIOS e WELLER, 1991; CHO e RHEE, 2004). Filmes comestíveis à base de proteínas podem formar ligações em posições diferentes e oferecem grande potencial para a formação de ligações diversas.

A concentração de proteína tem sido mostrada em muitos estudos por ter uma influência considerável sobre a estabilidade térmica das globulinas de soja. Efeito de diferentes condições de pH, meio iônico e a hidrólise foram relatados (RYAN et al., 2008). Kokoszka et al., (2010) estudaram as características do efeito de isolado protéico de soja e concentração de plastificante glicerol sobre as propriedades térmicas analisadas por calorimetria diferencial de varredura.

O desenvolvimento de filmes de colágeno é uma área de pesquisa com aplicações relevantes e os impactos econômicos para as indústrias de alimentos e de biotecnologia. Em geral, estes são usados para acondicionar alimentos em apresentações comerciais, maturações e preservações (HOOD, 1987; CUQ et al., 1998; RUBAN, 2009; USTUNOL, 2009; WOLF et al., 2009).

A principal diferença entre gelatinas de pescados e de mamíferos envolve sua temperatura da solução de gelificação. Soluções de gelatina de peixe, especialmente aqueles derivados de espécies de águas frias, com temperaturas de gelificação muito menor do que soluções de gelatina de mamíferos. Isto é principalmente devido à gelatina de peixe ter menor concentração de prolina e hidroxiprolina. Vários estudos sobre os filmes de gelatina de peixe envolveram gelatina extraída de bacalhau do mar Báltico (KOLODZIEJSKA et al., 2006; KOLODZIEJSKA e PIOTROWSKA, 2007), tilápia (PRANOTO et al., 2007), atum (GOMEZ-GUILLEN et al., 2007; GOMEZ-ESTACA et al., 2009), e polaca do Alasca e salmão rosa do Alasca (CHIO et al., 2009).

Sobral e Ocuno (2000) verificaram a influência do ácido acético ou o ácido láctico como agentes acidificantes sobre a permeabilidade ao vapor de água de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de carne bovina, em função da concentração de glicerina.

2.3 PROPRIEDADES DOS FILMES

Os métodos utilizados para avaliação das propriedades dos filmes biopoliméricos são adaptados dos métodos tradicionais aplicados aos materiais sintéticos, levando em consideração, a grande sensibilidade, umidade relativa e a temperatura, que estão envolvidas com os filmes biopoliméricos (GUILBERT e BIQUET, 1995).

As propriedades dos filmes estão relacionadas com as interações entre as moléculas dos componentes que formam a matriz polimérica e o componente estrutural ou reforço. O uso de filmes para uma determinada aplicação vai depender de suas propriedades mecânicas, de barreira a gases, permeabilidade ao vapor de água, térmicas, ópticas e transparência.

2.3.1 Espessura

O controle da espessura dos filmes é importante para sua uniformidade, repetibilidade das medidas de propriedades e validade das comparações entre as propriedades de biofilmes. Quando se conhece a espessura de um material e sua natureza química é possível obter informações teóricas sobre suas propriedades mecânicas de barreira a gases e ao vapor de água, bem como fazer estimativas sobre a vida-útil de alguns alimentos acondicionados neste material (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

A espessura deve ser padronizada de acordo com a aplicação requerida do filme, que depende do alimento que se deseja acondicionar (SARMENTO, 1999). Além disso, as características das formulações devem ser levadas em consideração quando se deseja controlar a espessura de um filme biopolimérico (SOBRAL, 1999).

2.3.2 Cor e Transparência

As propriedades ópticas dos filmes influenciam a apresentação do produto embalado e estão relacionadas à cor, brilho e transparência dos filmes. Na área de alimentos muitas vezes é desejável uma embalagem transparente que permita a visualização do produto acondicionado (SAKANAKA, 2007).

O brilho e a transparência de algumas embalagens plásticas constituem uma ferramenta para uma boa apresentação visual do produto, porém, muitas vezes se faz necessário a proteção contra a incidência de luz de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Quando a luz incidente atravessa o material com um mínimo de absorção ou reflexão o material é denominado de transparente. Um material é dito opaco quando absorve e/ou reflete toda luz que incide sobre ele, sem que ocorra transmissão de luz (VICENTINI, 2003). A transparência pode ser avaliada tanto por transmitância quanto por absorvância, dependendo do tipo do material (VEIGA-SANTOS et al., 2005). E entre os vários tipos de equipamento para avaliar a transparência pode ser utilizado um espectrofotômetro (BOURTOOM e CHINNAN, 2009).

2.3.3 Propriedades mecânicas

Para a utilização de filmes e compósitos biodegradáveis como materiais de embalagem, é necessário que os mesmos sejam resistentes à ruptura e abrasão, e flexíveis. Estas características mecânicas permitem que o produto embalado se mantenha íntegro e protegido durante o manuseio e transporte e a embalagem se adapte a eventuais deformações evitando danos mecânicos. Estas características de resistência dependem das propriedades de cada componente do filme e suas interações. Uma forma de avaliar estas propriedades dos materiais é através de ensaios de tração, onde se obtém o perfil da tensão ou força pela deformação (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

As principais propriedades mecânicas dos filmes biopoliméricos são a resistência a tração e a alongação na ruptura. O módulo de Young também tem sido analisado. A resistência à tração é a resistência oferecida pelo material no ponto da ruptura. A alongação é a relação percentual entre a alongação do corpo de prova no teste e seu comprimento inicial. O módulo de Young é a relação entre a resistência a tração e a deformação na região elástica, em que a resposta do corpo de prova a alongação é crescente e linearmente proporcional à tração imposta (SARANTÓPOULOS et al., 2002; VAN DE VELDE e KIEKENS, 2002).

Os ensaios podem ser feitos em texturômetro e envolve a separação, a velocidade constante, das garras que prendem as extremidades do corpo-de-prova para se obter a tensão máxima suportada para uma dada deformação. E ainda, a força aplicada requerida para que o corpo-de-prova se deforme até a ruptura.

2.3.4 Propriedades de barreira

A capacidade de uma embalagem de resistir à absorção ou evaporação de gases e vapores, resistir à permeação de lipídeos e à passagem de luz é definida como barreira (SARANTÓPOULOS et al., 2002). O uso de embalagens na conservação de alimentos visa limitar as transferências e trocas de gases e vapor de água entre o alimento e o meio ambiente (MALI, 2002; MÜLLER, 2007; SANTOS, 2010). A permeabilidade é definida como uma propriedade do par filme/permeado

(vapor de água, oxigênio e gás carbônico), em condições definidas de temperatura, umidade relativa, espessura e diferença de pressão parcial de vapor.

A propriedade de barreira mais discutida em filmes hidrofílicos é a permeabilidade ao vapor de água, que é influenciada por características intrínsecas do material (grau de cristalinidade, densidade, polaridade e simetria), teor de plastificante e pelas condições ambientais de umidade relativa e temperatura as quais se encontra expostos (MÜLLER, 2007).

A permeabilidade consiste em um processo de dissolução e difusão e não transporte através de poros. De acordo com Roger (1985), o soluto dissolve-se em um lado do filme e se difunde até o lado oposto devido a uma gradiente de potencial químico. Segundo Roy et al., (2000), a transferência de vapor de água através de filmes biopoliméricos envolve etapas de adsorção do vapor de água na superfície do filme, solubilização do vapor na matriz polimérica, difusão do vapor através do filme e dessorção do vapor na outra superfície do filme.

Vários alimentos são susceptíveis à deterioração devido ao aumento do teor de umidade, por isso a permeabilidade ao vapor de água (PVA) é de grande importância no desenvolvimento de embalagens a fim de obter a vida-útil desejada (FELDMAN, 2001). A escolha de uma embalagem adequada depende das propriedades de permeabilidade que esta pode oferecer (VICENTINI, 2003). Uma embalagem pode ser considerada como de baixa resistência ao vapor de água, quando os valores forem menores que $8 \text{ g mm m}^{-2} \text{ dia}^{-1} \text{ KPa}^{-1}$ e de alta resistência quando for menor que $0,8 \text{ g mm m}^{-2} \text{ dia}^{-1} \text{ KPa}^{-1}$ (GARCIA et al., 1989). O método gravimétrico é o mais utilizado na determinação da PVA.

2.3.5 Cristalinidade

As propriedades funcionais macroscópicas dos filmes e compósitos estão relacionadas às interações moleculares e a ordenação cristalina de sua estrutura e podem ser detectadas mediante as análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e Difração de Raios X (XRD).

Pela difração de raios X (XRD) é possível verificar a formação e existência de estruturas cristalinas, permitindo realizar estudos sobre a morfologia dos materiais, além de ser possível determinar se as lamelas da nanoargila se separam e, por tanto, a distância interplanar entre eles (d_{001}). Assim, é possível esclarecer se nos filmes obtidos a nanoargila tem uma estrutura intercalada, ou ainda, se há uma estrutura uniformemente esfoliada na matriz polimérica, visto que quanto maior o valor de d_{001} , melhor a qualidade do nanocompósito formado e, conseqüentemente, o filme apresenta melhores propriedades mecânicas, de barreira e desempenho ótico (WILHELM et al., 2003; RAY e OKAMOTO, 2003; CARASTAN, 2007; CAUVIN et al., 2007).

Nas análises por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) é possível analisar a absorção de energia eletromagnética de acordo com a vibração das ligações existentes entre os átomos das moléculas da amostra. Através da incidência de comprimentos de ondas específicos de infravermelho sobre a amostra, e energia absorvida é registrada e comparada com uma referência, sendo possível verificar variações nas frequências das vibrações específicas e estruturais das moléculas dos compósitos (nanoargila, amilose, amilopectina, glicerol e Poli (butileno adipato co-tereftalato)) (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca.

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução menor que 1 nm (DEDAVID et al., 2007).

2.3 APLICAÇÃO DE FILMES E COBERTURAS COMESTÍVEIS

Em relação à nomenclatura, a maioria dos pesquisadores usa os termos “filme” e “cobertura” indiscriminadamente. No entanto, a cobertura é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que o filme é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto (GONTARD e GUILBERT, 1995; KROCHTA e MÜLDER-JOHNSTON, 1997).

A utilização de filmes e coberturas comestíveis está relacionada com sua capacidade de agir como um adjunto para promover maior qualidade, estendendo a vida-útil e possibilitando a economia com materiais de embalagem final (KESTER e FENNEMA, 1986).

Filmes comestíveis têm sido considerados uma alternativa para estender a vida-útil de frutas e vegetais, causando efeito semelhante ao da utilização de uma atmosfera modificada (PARK, 1999). O controle da permeabilidade ao vapor de água, oxigênio e dióxido de carbono influencia diretamente a estabilidade do fruto durante a sua estocagem.

Coberturas filmogênicas elaboradas com gelatina, triacetina e ácido láurico foram aplicadas sobre goiabas brancas e mostraram-se efetivas na extensão da vida-útil das goiabas em relação às frutas in natura sem cobertura, sendo bem aceitas pelos consumidores durante 20 dias e sob refrigeração a 12 °C (FAKHOURI e GROSSO, 2003).

CAPÍTULO 3

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)

3.1 INTRODUÇÃO

O isolamento de proteína é basicamente, um processo de extração que visa obter um produto livre de interferentes e, portanto, mais concentrado, o qual, por isso tem propriedades e características específicas de conservação e uso. Os isolados protéicos são obtidos de diversos alimentos, tais como soja, feijão, leite, frango, pescado e outros (FREITAS, 2011).

A preparação de concentrados ou isolados protéicos provenientes de subprodutos da indústria processadora de pescado, obtidos pela aplicação do processo de mudança de pH (ou pH *shifting process*), tem recebido mais atenção nos últimos anos (FONTANA et al., 2009). Este processo pode ser usado para qualquer espécie de pescado, remove essencialmente todos os lipídios e aumenta o rendimento protéico.

A produção dos isolados protéicos poderia ter seu valor aumentado se todas as frações após a solubilização das proteínas musculares fossem utilizadas, percebendo-se assim, aplicações também para a fração não-solúvel (KRISTINSSON e INGADOTTIR, 2006). Poucos trabalhos têm sido realizados sobre a avaliação da parte não-solúvel das proteínas. O valor do processo poderia aumentar significativamente pela continuação do mesmo, ou encontrando uso e aplicação para as frações não solubilizadas (SLIZYTE et al., 2005).

Batista et al., (2003) avaliaram o conteúdo protéico total recuperado a partir de sardinha (*Sardina pilchardus*) e pescada azul (*Micromesistius poutassou*). Estes autores utilizaram processos de solubilização ácida e alcalina, similares aos descritos anteriormente e obtiveram 73% e 77% de proteína recuperada, respectivamente, para a sardinha e 53,6% e 49,1%, respectivamente para a pescada azul.

Os processos de solubilização, ácida e alcalina, utilizam o princípio de que a solubilidade do material contendo proteína quando homogeneizado com água será afetada pelo pH da mistura. Em condições extremamente ácidas ou alcalinas, as forças de repulsão atuam sobre as proteínas miofibrilares e citoesqueléticas, ocorrendo interações com água, e acontecendo a solubilização da mesma (NOLSOE e UNDELAND, 2009).

Utilizando uma mistura de subprodutos de pescada (*Merluccius capensis*), Batista et al., (2006) avaliaram a quantidade de proteína que poderia ser recuperada

usando os processos de solubilização ácida e alcalina. Após a remoção da pele e ossos, o resto dos subprodutos foi triturado, uma parte sofreu uma pré-lavagem e a outra foi utilizada normalmente. O conteúdo protéico obtido foi de 58,7% para o processo ácido e 63% para o alcalino, utilizando material sem lavagem. A produção de proteína correspondente para o material que sofreu a pré-lavagem foi de 43,6% para a extração ácida e 50,1% para a alcalina.

Utilizando processos de solubilização protéica, seja ácido ou alcalino, Undeland et al., (2002) encontraram 74% e 68%, respectivamente, de proteína recuperada a partir do músculo branco de arenque (*Clupea harengus*). A baixa produção apresentada pelo processo alcalino foi atribuída à grande quantidade de sedimento formado na primeira centrifugação.

Os objetivos deste trabalho foram: Obter isolado protéico utilizando como matéria-prima a corvina, um pescado de baixo valor comercial e avaliar a composição proximal e as propriedades funcionais de capacidade de retenção de água e solubilidade do isolado protéico de corvina.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi processada a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*) proveniente de uma indústria de pescado da cidade do Rio Grande, RS. Os espécimes foram transportados em caixas de isopor com gelo até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foi realizado o resto do processamento. Assim, o pescado foi imediatamente lavado em solução de cloro orgânico (diclorocianurato, concentração de 0,2 g/L), logo eviscerados e submetidos à filetagem, e processados em separador mecânico de carne (Modelo HP250 High Tech, São Paulo, Brasil) para obtenção de carne mecanicamente separada (CMS) de corvina.

3.2.1.1 Caracterização da matéria-prima

A determinação da composição proximal da CMS de corvina foi realizada segundo metodologia oficial (AOAC, 2000), onde as análises de umidade foram realizadas por método de secagem em estufa com circulação de ar a 100 °C, até peso constante (Método 950.46); as proteínas foram determinadas pelo método de micro Kjeldahl ($N \times 6,25$) (Método 928.08); os lipídios pelo método de Soxhlet (Método 960.39); e as cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla a 600 °C (Método 920.153), em três repetições para cada análise.

3.2.2 Processo tecnológico para obtenção de isolado protéico de corvina

O isolado protéico de corvina foi obtido utilizando processo de variação de pH (adaptado de NOLSOE e UNDERLAND, 2009; FREITAS, 2011) para solubilizar e isolar proteína.

A Figura 3.1 mostra o fluxograma de operações do processo tecnológico utilizado para obtenção de isolado protéico de corvina (IPC).

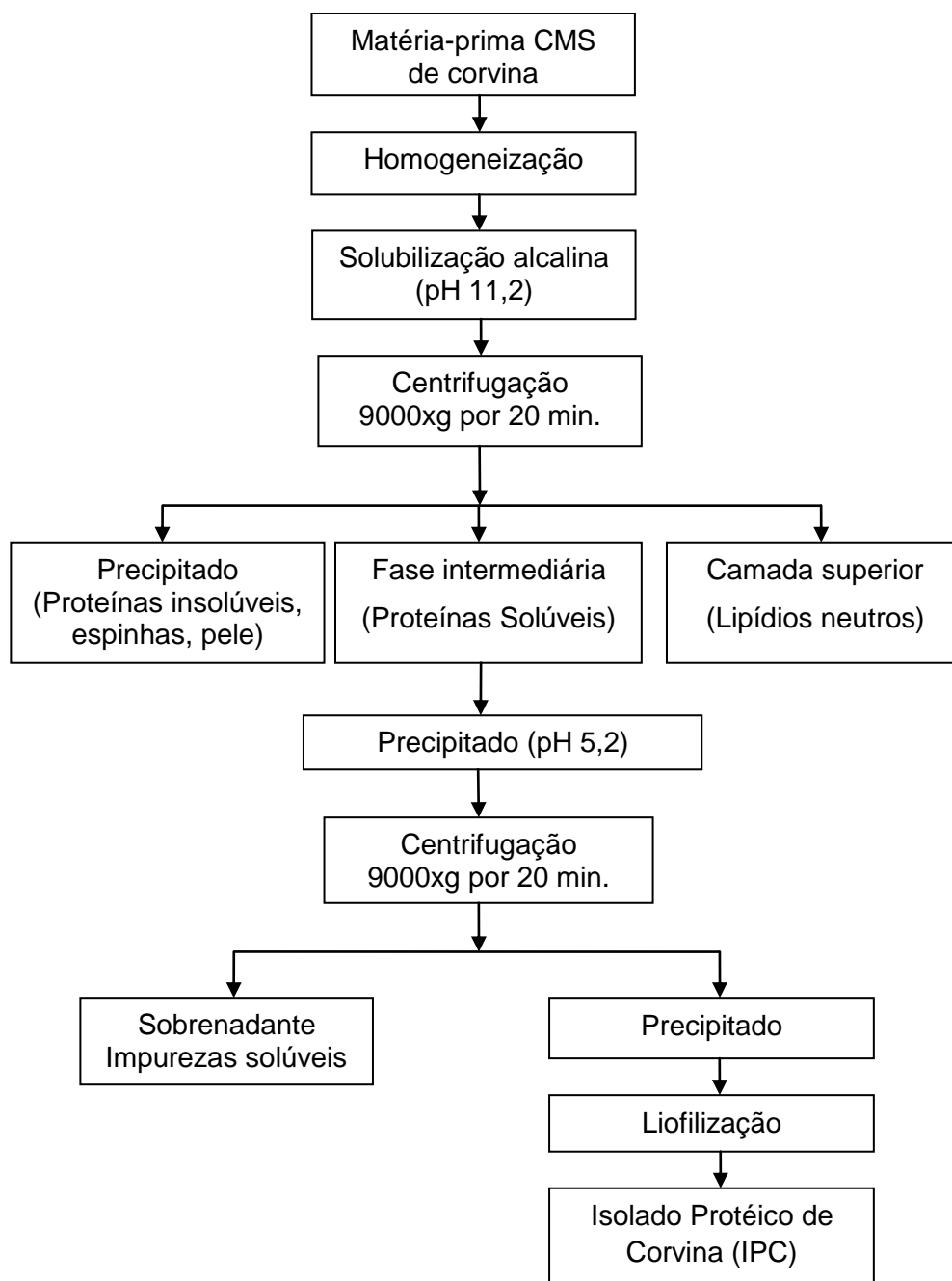


Figura 3.1 Fluxograma de operações do processamento tecnológico para obtenção de isolado protéico de corvina por solubilização alcalina e precipitação da proteína (adaptado de KRISTINSSON et al., 2005).

3.2.2.1 Descrição do processo

A matéria-prima utilizada para obtenção do isolado protéico de corvina foi carne mecanicamente separada (CMS) de corvina. Ela foi homogeneizada com água destilada na proporção 1:9 (p:v) a 4 °C durante 60 s utilizando agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil).

Após a etapa de homogeneização foi realizado o processo de solubilização alcalina da proteína. Foi empregado, como agente alcalinizante o hidróxido de sódio 1 N, onde o pH de solubilização foi de 11,2 a temperatura constante de 4 °C controlada por banho ultratermostático (QUIMIS, modelo 214 D2, São Paulo, Brasil) durante 20 minutos sob agitação constante com agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil).

Após esta etapa, foi realizada uma primeira centrifugação a 9000xg por 20 minutos em centrífuga de copos (SIGMA, modelo 6-15, Osterode am Harz, Alemanha) com o intuito de separar o produto solubilizado em três fases: lipídios, proteínas solúveis e proteínas insolúveis, facilitando a coleta do sobrenadante.

A fase intermediária da centrifugação, correspondente às proteínas solúveis, foi reservada e submetida à precipitação isoelétrica da proteína em pH 5,2 a 4 °C sob agitação constante com agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil) durante 20 minutos. Logo após foi realizada a segunda centrifugação feita a 9000xg por 20 minutos para separar a fração precipitada, facilitando assim a coleta do precipitado, sendo obtido o isolado protéico.

O isolado protéico de corvina foi submetido à liofilização. As amostras foram mantidas antes em ultra freezer à temperatura de -70 °C por 24 horas, e logo foram liofilizadas utilizando um liofilizador (Labconco, modelo 195, Missouri, Estados Unidos) por um tempo máximo de 48 horas.

Após a liofilização, o produto foi triturado em moinho doméstico de facas duplas (Arno, modelo PL, São Paulo, Brasil).

Finalmente o isolado protéico foi armazenado sob congelamento à temperatura de -20 °C.

3.2.3 Caracterização do IPC

3.2.3.1 Composição proximal

A determinação da composição proximal do IPC foi realizada segundo metodologia oficial (AOAC, 2000), onde as análises de umidade foram realizadas por secagem das amostras em estufa com circulação de ar a 100 °C, até peso constante; as proteínas foram determinadas pelo método de micro Kjeldahl ($N \times 6,25$); os lipídios pelo método de Soxhlet e as cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla a 600 °C, com três repetições para cada análise.

3.2.3.2 Propriedades funcionais

3.2.3.2.1 Solubilidade

Foi determinada de acordo com o método utilizado por Morr et al. (1985) com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Pesou-se 0,5 g de amostra em um béquer de 50 mL, adicionou-se 2 mL de NaCl 0,1 M e 48 mL de água destilada. O pH foi ajustado com HCl 1 N e NaOH 1 N. A dispersão foi mantida sob agitação por 30 minutos em agitador magnético (Quimis, modelo 261-2, São Paulo, Brasil), em seguida centrifugou-se a dispersão a 8667xg por 20 minutos em centrífuga de tubos (Biosystems, modelo: MPW-350R, Polónia). O teor de proteína solúvel no sobrenadante foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Lowry et al., (1951). A solubilidade da proteína foi calculada conforme a equação 3.1.

$$\%S = \left(\frac{\text{Quantidade de proteína no sobrenadante}}{\text{Quantidade de proteína na amostra}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.2.2 Determinação da capacidade de retenção de água (CRA)

Foi determinada de acordo com o método utilizado por Regenstein et al., (1984). Foram preparadas dispersões protéicas a 1% com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Adicionou-se à dispersão, 2 mL de NaCl 0,1 M para obtenção de uma pasta homogênea, em seguida adicionou-se a solução tampão correspondente de acordo com o pH até o volume de 40 mL. A dispersão foi mantida sob agitação por 15 minutos e centrifugada a 9000xg por 20 minutos. As proteínas solúveis no sobrenadante foram

quantificadas pelo método de Bradford (1976), e descontadas do total de proteína da amostra original. A CRA foi calculada conforme a equação 3.2.

$$\text{CRA} = \frac{\text{Quantidade de água retida (g)}}{\text{Massa de proteína original (g)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização da matéria-prima

Como citado por diferentes autores (YEANNES e ALMANDOS, 2003; ORDÓÑEZ, 2005; GARCIA-SIFUENTES et al., 2009), o conhecimento da composição da matéria-prima é de fundamental importância na aplicação de diferentes processos tecnológicos, além de influenciar no aspecto de qualidade geral, bem como nos atributos sensoriais e na estabilidade do armazenamento do produto final.

O valor médio da composição proximal da carne mecanicamente separada (CMS) de corvina é apresentado na Tabela 3.1

Tabela 3.1 Composição proximal de CMS de corvina (*Micropogonias furnieri*).

Componente*	CMS de corvina	
	B.U.	B.S.
Umidade (%)	78,53 ± 0,12	-
Proteína (%)	17,32 ± 0,19	81,20 ± 0,19
Lipídeos (%)	2,82 ± 0,11	13,22 ± 0,11
Cinza (%)	1,19 ± 0,09	5,58 ± 0,09

*Resultado expresso como média e desvio padrão de três determinações

Onde: B.U.: Base úmida, B.S.: Base seca

Pode-se observar na Tabela 3.1 que os valores de proteína encontrados neste trabalho estão de acordo com o encontrado por Freitas (2011) para músculo e resíduos de corvina com 18,24 e 15,24%, respectivamente.

Centenaro e Salas-Mellado (2008) obtiveram 80,2% de umidade; 18,1 de proteína; 1,1 % de lipídios e 0,70% de cinzas para o filé de corvina. De acordo com Taco (2006) a composição proximal da parte comestível da corvina apresenta 79,4% de umidade, 18,6% de proteína, 1,6% de lipídios e 1,1% de cinzas. Observa-se que estes valores encontrados para corvina apresentam-se próximos aos da literatura.

Concordando com o afirmado por Yeannes e Almandos (2003) e Badolato et al., (1994) vários fatores podem contribuir para a grande variedade na composição da parte comestível dos pescados, tais como: espécie, sexo, idade do pescado, tamanho, local de captura, temperatura da água, natureza da alimentação e estação do ano.

3.3.2 Composição proximal do IPC

A Tabela 3.2 mostra a composição proximal apresentada pelo isolado protéico de corvina obtido pelo processo de variação de pH, considerando a solubilização alcalina e precipitação isoelétrica das proteínas.

Tabela 3.2 Composição proximal apresentada pelo isolado protéico de CMS corvina

Componente (%)	Isolado Protéico de Corvina	
	B.U.	B.S.
Umidade	3,83 ± 0,19	-
Proteína	92,37 ± 0,48	97,87 ± 0,31
Lipídios	0,72 ± 0,01	0,76 ± 0,01
Cinzas	1,29 ± 0,05	1,37 ± 0,06

*Resultado expresso como média e desvio padrão de três determinações

Onde: B.U.: Base úmida, B.S.: Base seca

Como o processo de solubilização ácida possui um maior risco de oxidação lipídica foi utilizado o processo de solubilização alcalina, devido a que as proteínas heme podem ser ativadas como prooxidantes em pH baixo (KRISTINSSON, 2001; NOLSOE e UNDERLAND, 2009). Como se pode observar na Tabela 3.2, o isolado protéico obtido de carne mecanicamente separada de corvina apresentou 97,87% de proteína (em base seca). O valor está acima dos encontrados por Freitas (2011), que encontrou valores de 97,49% e 93,11% (em base seca) para isolados protéicos de músculo e de resíduos de corvina, respectivamente. Estes valores também foram superiores aos encontrados por Martins et al., (2009) que encontraram 86,94% e 77,98% (em base seca) em isolados protéicos de músculo e de resíduos de corvina, respectivamente.

O teor de lipídios para IPC foi inferior a 0,8%. Martins et al., (2009) encontraram para o processo de solubilização alcalina um teor de lipídios de 6,6% e 4,4% para resíduos e músculos de corvina, respectivamente. A redução no teor lipídico ocorre porque esses componentes são separados por centrifugação, associados com a temperatura de solubilização de 4 °C o que contribuiu para a separação da gordura durante a centrifugação. O IPC apresentou 3,83% e 1,37% de umidade e cinzas (em base seca), respectivamente.

A Tabela 3.3 apresenta os valores médios para capacidade de retenção de água e solubilidade dos isolados protéicos de CMS de corvina obtidos pelo processo de solubilização alcalina e precipitação isoelétrica das proteínas.

Tabela 3.3 Valores médios para capacidade de retenção de água (CRA) e solubilidade do IPC proveniente de CMS de corvina.

pH	Propriedades funcionais*	
	CRA	Solubilidade
3	2,29 ± 0,75 ^e	39,13 ± 0,75 ^c
5	4,29 ± 0,19 ^d	14,21 ± 0,16 ^e
7	5,21 ± 0,59 ^c	18,61 ± 0,32 ^d
9	10,18 ± 0,31 ^b	59,83 ± 0,44 ^b
11	15,42 ± 0,18 ^a	103,46 ± 0,87 ^a

*Resultado expresso como média e desvio padrão de três determinações. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pode-se observar na Tabela 3.3 que o menor valor de CRA apareceu no pH 3, e o maior valor foi em pH 11. Sabe-se que em pH afastado do ponto isoelétrico das proteínas, a predominância de cargas de mesmo sinal provoca repulsão e afastamento entre as moléculas, deixando maior espaço para ser preenchido pelas moléculas de água aumentando, portanto, a CRA (PACHECO e SGARBIERI, 2002). Isto porque em pH abaixo de 5,0 e acima de 7,0, as moléculas de água se combinam com os grupos polares das proteínas e a CRA tende a aumentar.

Fontana et al., (2009) obtiveram valores máximos de 21,9 e 22,9 mL água/g proteína, em pH 11,0 para isolados obtidos de corvina pelo processo de solubilização ácido e alcalino, respectivamente. Estando acima dos valores encontrados no presente trabalho.

BATISTA et al., (2007) encontraram capacidade de retenção de água reduzida em proteínas extraídas de músculo de sardinha para ambos os processos de solubilização ácida e alcalina (aproximadamente 3 g/g), com resultados em pH 6,75.

Pode-se observar que o menor valor de solubilidade foi observado a pH 5 e os maiores valores em pH acima e abaixo deste. Em pH 11,0 os isolados protéicos foram totalmente solubilizados obtendo-se o maior valor.

Sabe-se que a solubilidade das proteínas varia em função do pH e da força iônica (PACHECO e SGARBIERI, 2002). Deve-se ressaltar que a desnaturação de proteínas, devido ao processo utilizado, pode contribuir para a diminuição da solubilidade (GARCIA-SIFUENTES et al., 2009) como demonstrado nos valores obtidos no presente trabalho.

Os resultados obtidos para solubilidade concordaram com os valores de Freitas, (2011) que encontrou valor de solubilidade de 2,01% em pH 5.0 em músculo de corvina extraído com NaOH, e com Sathivel e Bechtel (2008) que encontraram valor de solubilidade de 14% em pH 7.0 para isolado de filés de linguado extraído com NaOH (pH 11) e precipitação com H₂SO₄ (pH 5.5).

Os valores também podem ser comparados com Rawdkuen et al., (2009) que ao avaliar a solubilidade para proteína de músculo de tilápia em pH 7 obtiveram 0,57 mg/g para a proteína obtida pelo processo de solubilização alcalina e 0,23 mg/g para a proteína obtida pelo processo ácido. Estes mesmos autores discutiram que a baixa

solubilidade da proteína foi provavelmente causada pela desnaturação da proteína do músculo induzida pelo processo de mudança de pH.

CAPÍTULO 4

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
FILMES NANOCOMPÓSITOS DE ISOLADO
PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*)
E ARGILA ORGANOFÍLICA**

4.1 INTRODUÇÃO

Existe grande interesse no desenvolvimento de materiais de embalagem biodegradáveis obtidos a partir de matérias-primas agrícolas renováveis e de subprodutos de processamento de pescado, como consequência dos problemas ambientais e ecológicos, associados com a eliminação das embalagens de plástico tradicional (THARANATHAN, 2003; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2009).

Filmes comestíveis podem ser preparados a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou da combinação desses componentes (CUQ et al., 1997; CAO et al., 2007). Estes filmes podem estender a vida-útil e melhorar a qualidade dos alimentos, fornecendo as barreiras à transferência de massa, melhorando as características mecânicas, integridade ou manipulação e/ou propriedades funcionais tais como agentes antimicrobianos, antioxidantes, probióticos, nutrientes, sabores, cores e assim por diante (KROCHTA, 1992; MEI e ZHAO, 2003; SALMIERI e LACROIX, 2006; BOURTOOM, 2008; HAMBLETON et al., 2009).

As propriedades funcionais dos filmes comestíveis dependem das características dos materiais utilizados para sua preparação. Os principais materiais formadores destes filmes são polissacarídeos (amido, carragena, alginato), proteínas (glúten de trigo, isolado protéico de soro, caseinato, proteína de soja) e lipídeos (ceras e ácidos graxos). Os materiais à base de lipídios, devido ao seu caráter hidrofóbico, oferecem melhor barreira à umidade do que os provenientes de polissacarídeos e proteínas, mas oferecem pouca resistência à transferência de gases e tem resistência mecânica inferior. Por outro lado, os hidrocolóides formam boa barreira de oxigênio e dióxido de carbono, mas devido a seu caráter hidrofílico, oferecem uma barreira de umidade menos eficaz (MILLER e KROCHTA, 1997; KRISTO et al., 2007; MURILLO-MARTÍNEZ, 2011).

Uma das etapas mais críticas envolvidas na preparação de filmes comestíveis é a secagem (THAKHIEW et al., 2010). No caso de filmes protéicos, as condições de secagem podem influenciar as propriedades finais do material, podendo as proteínas, alterar a estrutura em função de parâmetros de processamento (TAPIA-BLÁCIDO et al., 2005).

O tipo e a concentração de plastificante são outros fatores críticos que afetam as propriedades mecânicas, bem como a propriedade de barreira de vapor de água de

filmes de gelatina (SOBRAL e HABITANTE, 2001; JONGJAREONRAK et al., 2006). Devido à hidrofiliabilidade de glicerol, um plastificante usado no filme à base de proteínas, a sua utilização em menor concentração pode ser um meio promissor para melhorar a propriedade de barreira de água. Junto com a clivagem de cadeias peptídicas, poderia ser diminuída a rigidez dos filmes e pode ser necessária menor quantidade de plastificante (HOQUE et al., 2011).

A adição de um plastificante adequado é altamente essencial para produzir um filme melhor. Um plastificante é uma pequena molécula de baixa volatilidade que, quando adicionada a materiais poliméricos, modifica a organização tridimensional, diminui as forças intermoleculares, e aumenta o volume livre e mobilidade da cadeia. Como resultado dessas mudanças na organização molecular, o plastificante modifica as propriedades funcionais de filmes aumentando a extensibilidade e flexibilidade e diminuindo a coesão, elasticidade, propriedades mecânicas e rigidez. Plastificantes mais utilizados de grau alimentício é o glicerol e sorbitol (SWAIN et al., 2004).

A literatura apresenta diferentes estudos sobre propriedades de barreira, mecânicas e físico-químicas de filmes de amido, gelatina e quitosana e dos aditivos utilizados para melhorar as propriedades dos filmes (CHEN e LAI, 2008; MONTANO-LEYVA et al., 2008; CHEN et al., 2009; ZHOU et al., 2009; VARGAS et al., 2011; PEREDA et al., 2011; MOHAN et al., 2012; BONILLA et al., 2012; LIU et al., 2012). No entanto, pouca informação está disponível sobre filmes nanocompósitos à base de proteínas e outros componentes.

Nesse aspecto, os objetivos deste capítulo foram desenvolver e caracterizar filmes nanocompósitos provenientes de isolado protéico de corvina (IPC) e montmorilonita (MMT) em função da concentração de glicerol, concentração de IPC e concentração de MMT. Foi avaliada a influência destas variáveis, em função das propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação, módulo de elasticidade, força na ruptura e deformação na ruptura), espessura, da solubilidade em água do filme, propriedades ópticas (transparência), de barreira (permeabilidade ao vapor de água), análise de microscopia eletrônica de varredura, análises estruturais em espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e difração de raios-X.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Matéria-prima

No desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC e montmorilonita a matéria-prima utilizada foi o isolado protéico obtido de CMS de corvina pelo processo de variação de pH (adaptado de NOLSOE e UNDERLAND, 2009; FREITAS, 2011) como mostrado no Capítulo 3, plastificante glicerol (Synth P.A.) e nanoargila montmorilonita produzida pela Southern Clay Products e Aldrich com tamanho de partícula de aproximadamente 1 – 100 nm.

4.2.2 DESENVOLVIMENTO DOS FILMES NANOCOMPÓSITOS DE IPC e MMT

Para o desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina (IPC) e argilas organofílicas foi executado um planejamento experimental de 3 níveis e 3 fatores com 3 réplicas no ponto central, sugerido por Box e Behnken (1960). Foi aplicada metodologia de superfície de resposta (MSR) para estudar os efeitos simultâneos das variáveis independentes, concentração de isolado protéico de corvina (IPC = 2; 3,5 e 5 g/100 g de solução filmogênica); concentração de montmorilonita (MMT = 0,3; 0,5 e 0,7 g/100 g de solução filmogênica); e plastificante glicerol (G = 25, 30 e 35 g/100 g de IPC em base seca) sobre as respostas resistência à tração (MPa), alongação (%), força na ruptura (N), permeabilidade ao vapor de água ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{KPa}^{-1}$) e solubilidade (%). Para calcular a análise de variância e metodologia de superfície de resposta, foi utilizado o programa Statistica 6.1 for Windows. Isto é mostrado na Tabela 4.1.

Os níveis, de concentração de isolado protéico de corvina (IPC); concentração de montmorilonita (MMT); e plastificante glicerol, foram escolhidos através de testes preliminares e através de levantamento bibliográfico. O planejamento de Box e Behnken foi escolhido com o intuito de reduzir o número de experimentos que sejam representativos, os experimentos de Box-Behnken são caracterizados por delineamentos com 3 níveis dos fatores e por modelos de segunda ordem.

Tabela 4.1. Variáveis utilizadas no planejamento experimental de Box e Behnken para desenvolvimento dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variáveis codificadas	Variáveis reais		
	IPC (g)*	MMT (g)*	G (g/100 g de IPC)*
-1	2,0	0,3	25
0	3,5	0,5	30
+1	5,0	0,7	35

*Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita, G: Glicerol

Os filmes poliméricos foram desenvolvidos pela técnica de *casting*, onde cada solução dos filmes foi preparada segundo planejamento experimental da Tabela 4.1, inicialmente no preparo de uma dispersão de IPC em água destilada, em béquer de 50 mL. Esta dispersão aquosa foi mantida com agitação suave e constante por 10 minutos com agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil) a 30 °C em banho ultra-termostático (QUIMIS, modelo 214 D2, São Paulo, Brasil), para hidratação do IPC. Posteriormente à hidratação, ajustou-se o pH da dispersão para 11,2 com adição de NaOH 1 N (Merck) utilizando pHmetro de bancada (modelo Marconi PA 200, São Paulo, Brasil) mantendo-se agitação constante por mais 10 minutos. Em seguida, foi adicionada a MMT e a temperatura foi mantida a 30 °C. Após a completa dissolução do IPC e MMT, adicionou-se o glicerol (v/v) previamente solubilizado em água destilada (béquer de 40 mL) na mesma temperatura da solução filmogênica (30 °C) mantendo o pH em 11,2. Posteriormente, a solução filmogênica foi misturada no homogeneizador (Ultra-turrax modelo T25, IKA, Alemanha) por 5 minutos, logo a solução filmogênica foi aquecida a 80 °C por 30 minutos, depois foi espalhada em placas de Petri com diâmetro de 15 cm e submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS 314D 242, São Paulo, Brasil) a 40±1 °C por 12 h. Após a secagem, os filmes nanocompósitos foram armazenados por 48 h em dessecadores mantidos a 25±2 °C e umidade relativa de 55±2%, controlada usando solução saturada de cloreto de cálcio.

Foi utilizado placas petri de policarbonato para os filmes, porque os filmes nas placas petri de vidro apresentaram dificuldade em serem retirados das placas e fácil de apresentar fraturas e rupturas.

A Figura 4.1 mostra o fluxograma utilizado para desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina (IPC) e montmorilonita (MMT).

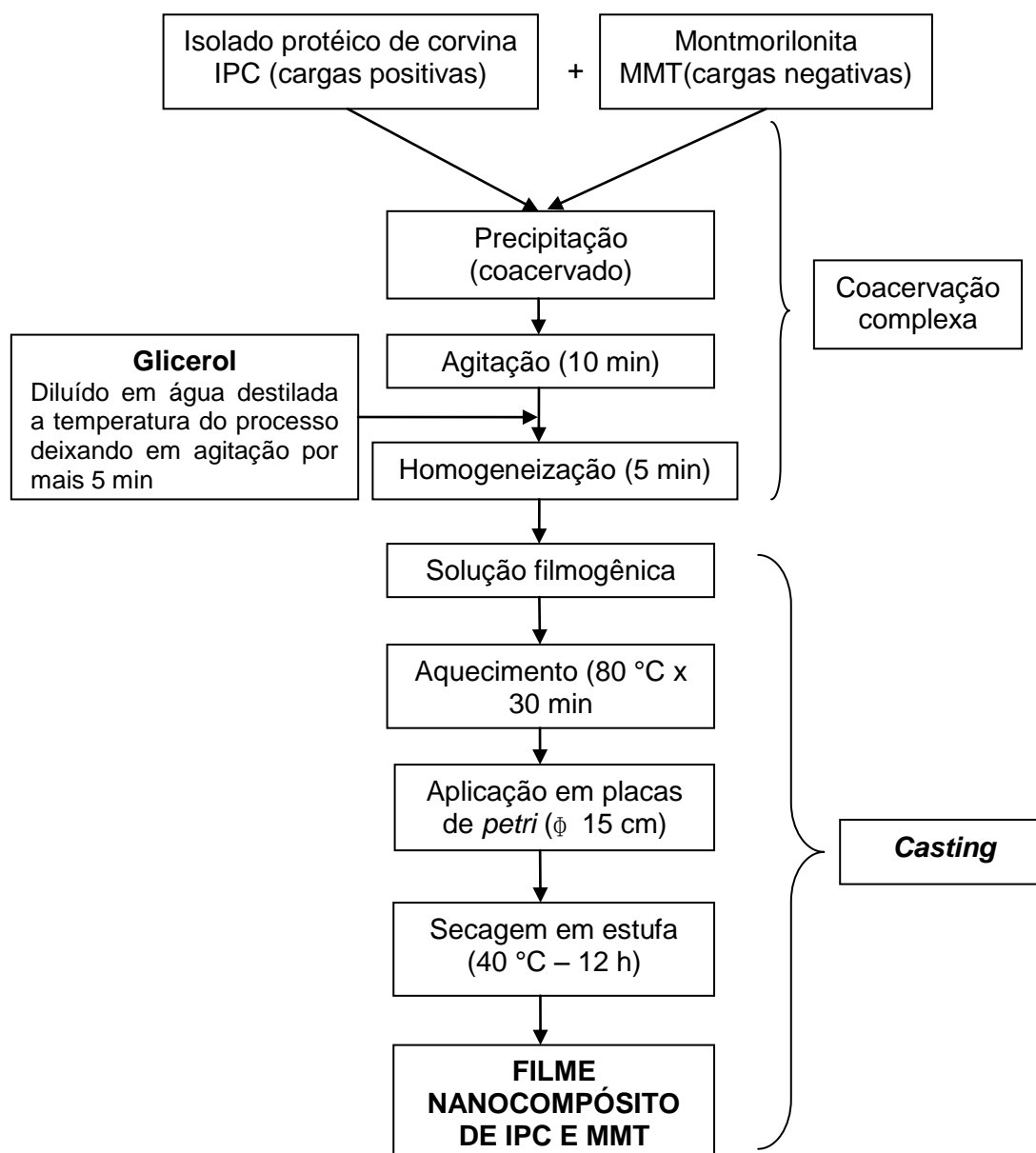


Figura 4.1. Fluxograma de operações utilizado para desenvolvimento de filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina (IPC) e montmorilonita (MMT).

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES NANOCOMPÓSITOS

4.2.3.1 Avaliação Subjetiva

Para a avaliação subjetiva dos filmes nanocompósitos, foram empregados parâmetros estabelecidos por Gontard (1991), verificando-se as seguintes características dos filmes: continuidade (ausência de ruptura ou fratura após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis ao olho nu, ou zonas de opacidade ou de cores diferenciadas) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura). Os filmes que não apresentaram tais características foram descartados.

4.2.3.2 Espessura

Foi medida a espessura dos filmes obtidos, utilizando-se um micrômetro digital (INSIZE IP54, São Paulo, Brasil). A espessura foi determinada como sendo a média de 8 medidas aleatórias em diferentes partes do filme. A espessura dos filmes foi padronizada em 123 μm , sendo esta medida escolhida através de testes preliminares como observado no Apêndice.

4.2.3.3 Propriedades mecânicas

A resistência à tração (RT) e alongação na ruptura (E) foi mensurada uniaxialmente esticando a amostra em uma direção usando um texturômetro (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), de acordo com o método padrão da American Society for Testing and Materials, ASTM D-882 (ASTM, 2001), com célula de carga de 50 N. As amostras de filmes foram cortadas, com 100 mm de comprimento e 25 mm de largura. Como parâmetros de execução de ensaios adotaram-se uma distância inicial entre as garras de 50 mm e uma velocidade de 20 mm min^{-1} .

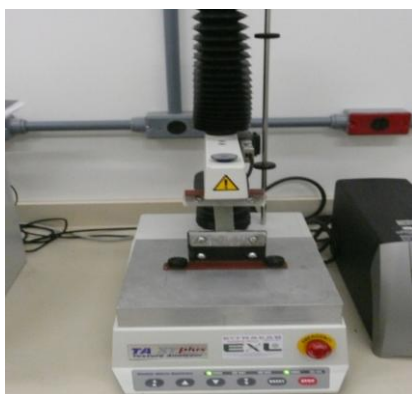


Figura 4.2 Filme nanocompósito de IPC e MMT em teste de tração utilizando Texturômetro TA.XTplus.

Observa-se, na Figura 4.3, a célula ou dispositivo onde foram fixados os filmes para as análises de perfuração, fabricado, seguindo o modelo de dispositivo desenhado por Araujo-Farro (2008), com o intuito de evitar deslizamentos dos filmes, e diminuir o erro na determinação dos valores de força na perfuração e deformação na perfuração.



Figura 4.3 Dispositivo para análise de perfuração desenhado e fabricado pelo autor desta pesquisa

Este dispositivo possui 40 mm de diâmetro de abertura e o filme é perfurado por uma sonda cilíndrica de 2 mm de diâmetro, que se desloca perpendicularmente a 1 mm/s de velocidade, como mostra a Figura 4.4.

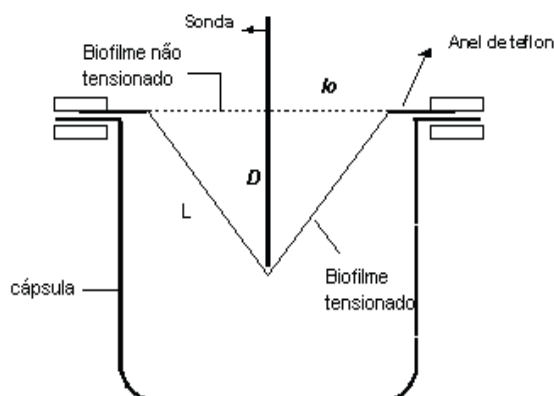


Figura 4.4 Esquema do sistema de determinação da deformação em teste de ruptura.

Onde, l_0 é o raio da superfície exposta do filme não tensionado, D é a distância penetrada pela sonda na ruptura e L é o novo raio da superfície do biofilme no ponto de ruptura (filme tensionado). No ponto de ruptura o raio da superfície (l_0) tem um aumento Δl . Substituindo L por $(l_0 + \Delta l)$, obtém-se a Equação 4.1 utilizada por (GONTARD, 1991) para o cálculo da deformação na ruptura. A força (F), expressada em Newtons (N), na ruptura e o deslocamento da sonda (D) na ruptura foram determinados diretamente das curvas de força em função da deformação, permitindo o cálculo da deformação na ruptura ($\Delta l/l_0$):

A força e a deformação na perfuração foram determinadas em testes de perfuração, segundo metodologia adaptada de Araujo-Farro et al., (2010). Foi possível determinar a deformação na ruptura, conforme Eq. (4.1).

$$\frac{\Delta l}{l_0} = \frac{\sqrt{D^2 + l_0^2} - l_0}{l_0} \quad (4.1)$$

4.2.3.4 Permeabilidade ao vapor de água

Foram realizados ensaios de permeabilidade ao vapor de água (PVA) gravimetricamente a 25 °C, de acordo com o método E96-95 (ASTM, 1995). As amostras de cada filme, em forma de discos ($D= 70$ mm), foram fixadas com parafina em células de permeação de alumínio, contendo cloreto de cálcio anidro granulado.

Essas células foram acondicionadas em dessecadores a 25 °C e 75% UR (cloreto de sódio anidro P.A.). A partir do ganho de massa do cloreto de cálcio granulado, mensurado em intervalos de 24 h, durante 7 dias, foi possível determinar o vapor de água transferido através do filme, conforme Eq. (4.2).

$$PVA = \frac{W}{t \cdot A} \cdot \frac{X}{\Delta P} \quad (4.2)$$

Onde W é a massa de umidade absorvida (g); t é o tempo de duração do teste (dias); X é a espessura média do filme (mm); A é a área da superfície exposta do filme (m^2), e ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor através do filme (kPa) ($P_2 - P_1$). A pressão de vapor na superfície interna do filme, a qual é a mesma da superfície do dessecante é definida como P_1 e a pressão de vapor na superfície externa do filme, a qual é a mesma do interior do ambiente produzida pela solução saturada de cloreto de sódio é definida como P_2 .

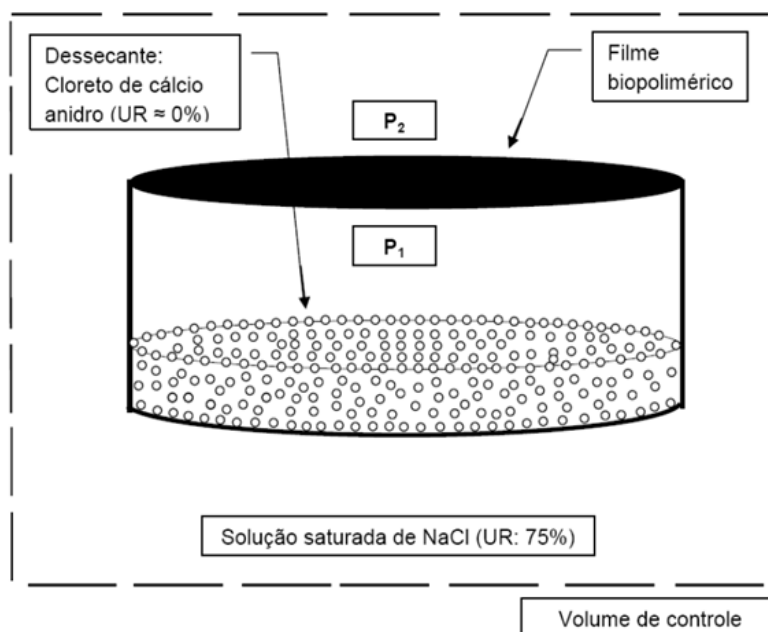


Figura 4.5 Esquema da célula de difusão utilizada para determinar a permeabilidade ao vapor de água dos filmes biopoliméricos.

Fonte: Souza, 2011.

Conforme a Figura 4.5, o filme em forma de disco é fixado à célula, onde um dessecante preenche o fundo da mesma e a umidade relativa (UR) no seu interior é assumida como 0%. A célula está armazenada em um ambiente cujo UR é de 75%

(ASTM, 1995). A pressão de vapor na superfície interna do filme, a qual é a mesma da superfície do dessecante é definida como P_1 e a pressão de vapor na superfície externa do filme, a qual é a mesma do interior do ambiente produzida pela solução saturada de cloreto de sódio é definida como P_2 .

4.2.3.5 Solubilidade do filme em água

Foi determinada a solubilidade em água dos filmes em triplicata, os filmes foram recortados em quadrados de 2 cm. Foi determinada a porcentagem inicial da matéria seca de cada amostra após deixar a mesma em estufa a 105 °C por 24 h. Após a pesagem, as amostras foram imersas em recipientes com 25 mL de água destilada, e agitadas lentamente e periodicamente por 24 h. Após esse período, as amostras foram removidas e secas (105 °C por 24 h), para determinação da massa da matéria seca que não se dissolveu em água (FAKHOURI et al., 2007).

4.2.3.6 Transparência

A transparência dos filmes foi determinada utilizando um espectrofotômetro (Biospectro SP-22, São Paulo, Brasil). As amostras de filme foram cortadas em retângulos e colocadas no lado interno da célula do espectrofotômetro. A transparência foi determinada a 600 nm através da Eq. (4.3), de acordo com o método D1746 (ASTM, 2003).

$$\text{Transparência} = \frac{\log \%T_{600}}{b} \quad (4.3)$$

Onde T_{600} é a transmitância a 600 nm, e b é a espessura do filme (mm).

4.2.3.7 Condições mais adequadas

Foram escolhidas as melhores condições para caracterizar os filmes nanocompósitos de IPC por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho e técnica de difração de Raios-X. A escolha deste tratamento foi

realizada em função dos melhores resultados apresentados pelas propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação, força na ruptura), permeabilidade ao vapor de água, e solubilidade. Foi feita uma comparação dos filmes nanocompósitos de IPC puro com filmes nanocompósitos de IPC e MMT os quais foram obtidos segundo o fluxograma da Figura 4.1.

4.2.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Centro Eletrônico de Microscopia (CEM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As características de superfície das amostras de filme foram analisadas usando um microscópio eletrônico de varredura (modelo JSM 6060, JEOL, Japão) operando a 10 kV (Figura 4.6). Duas amostras foram colocadas sobre *stubs* e revestidas com uma camada de ouro antes de obter as imagens.



Figura 4.6 Microscópio eletrônico de varredura modelo JSM 6060, JEOL, Japão. CME, UFRGS.

4.2.3.9 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

As análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os filmes

foram analisados usando equipamento espectrofotométrico FT-IV (Prestige 21, 210045, Japão) na região espectral de 4000-500 cm^{-1} (Xu et al., 2005).

4.2.3.10 Difração de Raios X (DRX)

As análises de difração de Raios X (DRX) foram realizadas no Instituto de Física (IF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foi utilizado um difratômetro Siemens D500 de geometria Bragg-Brentano com radiação de Cu, operado a 40 kV e 17,5 mA, monocromador de grafite para feixe de raios X difratado. As medidas foram obtidas com passos de 0,05 graus (2θ), tempo de contagem de 5 s/passo, e com intervalos de medida em 2θ de 2 a 60 graus.



Figura 4.7 Difratômetro Siemens D500, IF-UFRGS.

4.2.3.11 Análise estatística

Para determinar diferenças, estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre médias, foram utilizadas as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey, usando o software Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Avaliação Subjetiva dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT

Algumas características dos filmes de isolado protéico de corvina (IPC) foram analisadas visualmente, fundamentadas nos parâmetros de avaliação subjetiva estabelecidos por Gontard (1991), como mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Resultados da avaliação subjetiva dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Tratamento	Variáveis Independentes*			Característica**		
	IPC (g)	MMT (g)	Glicerol (%)	C	H	M
1	5	0,7	30	xxx	xx	xx
2	5	0,3	30	xxx	xx	xxx
3	2	0,7	30	xxx	xx	xxx
4	2	0,3	30	xx	xx	xx
5	5	0,5	35	xxx	xx	xxx
6	5	0,5	25	xxx	xx	xxx
7	2	0,5	35	xxx	xx	xx
8	2	0,5	25	xxx	xx	xxx
9	3,5	0,7	35	xxx	xx	xxx
10	3,5	0,7	25	xx	xx	xx
11	3,5	0,3	35	xx	xx	xx
12	3,5	0,3	25	xxx	xx	xxx
13	3,5	0,5	30	xxx	xx	xxx
14	3,5	0,5	30	xxx	xx	xxx
15	3,5	0,5	30	xxx	xx	xxx

Onde: *IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita **C: Continuidade; H: Homogeneidade; M: Manuseabilidade: **xxx** excelente; **xx** boa; **x** deficiente.

Os filmes nanocompósitos de IPC e MMT no aspecto de homogeneidade mostraram-se contínuos, sem fraturas ou rupturas após a secagem, sendo que todos os ensaios apresentaram boa continuidade e homogeneidade. Em relação à

característica de manuseabilidade, esta propriedade foi de excelente, para boa, na maioria dos ensaios.

Os filmes nanocompósitos de IPC e MMT que apresentaram boa manuseabilidade apresentaram mínima dificuldade em serem retirados das placas sem rasgos, porém, após serem retirados das placas, todos os filmes puderam ser manipulados sem risco de ruptura. No que diz respeito à facilidade de serem retirados das placas, esta depende do material da placa. Em face disso, observou-se que houve mais facilidade de retirada dos filmes, de forma íntegra, das placas de policarbonato que das placas de vidro. Quanto à homogeneidade, nenhum filme apresentou partículas insolúveis visíveis a olho nu.

De maneira geral, todos os filmes apresentaram-se transparentes, com coloração levemente amarelada e de bom aspecto (homogêneos).

Sabe-se, como reportado por vários autores (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000, MALI, 2002), que a obtenção de filmes pela metodologia de *casting* gera filmes de diferentes espessuras, dependendo da massa aplicada sobre o suporte (SOBRAL, 2000). Diferenças na espessura e a heterogeneidade apresentada por estes biomateriais dão lugar a respostas diferentes com relação aos testes mecânicos. Mali (2002) demonstrou que esta variabilidade nos testes mecânicos pode ser controlada pela obtenção de uma espessura constante, afirmando que é possível trabalhar, e avaliar as propriedades mecânicas (testes de tração e de perfuração) utilizando-se superfícies de resposta.

4.3.2 Propriedades dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT

A Tabela 4.3 apresenta a matriz utilizada para planejamento experimental de Box e Behnken, e os resultados obtidos nos testes de tração (resistência à tração, alongação e módulo de elasticidade) e perfuração (força na ruptura e deformação na ruptura) dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Tabela 4.3 Delineamento experimental de Box e Behnken e resultados obtidos nos testes de tração e perfuração dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variáveis Independentes				Testes Mecânicos*				
				Teste de tração			Teste de perfuração	
T	IPC (g)	MMT (g)	Glicerol (%)	RT (MPa)	E (%)	ME (MPa)	FR (N)	DR (%)
1	5	0,7	30	7,3±0,1	39,6±0,1	12,9±0,2	6,2±0,1	7,4±0,1
2	5	0,3	30	7,8±0,1	39,7±0,2	12,9±0,1	6,1±0,2	7,3±0,2
3	2	0,7	30	8,3±0,1	40,4±0,1	13,1±0,2	7,3±0,1	8,3±0,3
4	2	0,3	30	7,7±0,2	40,1±0,1	13,2±0,1	8,1±0,2	9,4±0,1
5	5	0,5	35	8,2±0,1	40,6±0,1	13,8±0,2	7,9±0,1	9,9±0,2
6	5	0,5	25	8,5±0,1	40,7±0,1	15,2±0,2	8,9±0,1	10,3±0,3
7	2	0,5	35	7,4±0,2	39,7±0,3	13,1±0,2	7,3±0,2	9,3±0,2
8	2	0,5	25	8,6±0,1	40,8±0,1	13,4±0,1	7,5±0,2	10,2±0,2
9	3,5	0,7	35	7,8±0,1	40,1±0,2	13,2±0,3	7,9±0,4	9,5±0,3
10	3,5	0,7	25	7,7±0,3	40,1±0,1	13,1±0,1	7,9±0,1	8,9±0,1
11	3,5	0,3	35	7,2±0,2	39,6±0,3	13,1±0,2	8,3±0,1	9,6±0,1
12	3,5	0,3	25	8,6±0,2	40,7±0,1	13,4±0,1	8,2±0,1	9,9±0,2
13	3,5	0,5	30	10,7±0,2	45,8±0,2	17,5±0,1	9,6±0,1	10,8±0,1
14	3,5	0,5	30	10,5±0,2	44,9±0,1	17,5±0,2	9,7±0,1	10,7±0,1
15	3,5	0,5	30	10,6±0,1	45,6±0,3	17,2±0,2	9,5±0,1	10,7±0,2

*Média de 3 repetições ± desvio padrão. Onde: T: Tratamentos, IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita, RT: Resistência à tração, E: Elongação, ME: Módulo de elasticidade, FR: Força na ruptura, DR: Deformação na ruptura.

De acordo com a Tabela 4.3, os valores de resistência à tração variaram entre 7,2 e 10,7 MPa e os valores de elongação de 39,6 a 45,8% sendo que os valores mais altos de resistência à tração e elongação foram obtidos no ponto central. Estes resultados estão dentro da faixa do encontrado por Araujo-Farro et al., (2010) que encontraram valores entre 2,63 e 23,90 MPa para resistência à tração em filmes de amido de quinoa. Estes resultados estão abaixo dos valores citados por Kvien et al., (2007) que encontraram para filmes nanocompósitos à base de amido uma resistência

à tração de 12,5 MPa. Os mesmos autores acharam um valor 31% menor para alongação quando comparado com os resultados obtidos no presente trabalho.

Os valores deste trabalho foram comparados com o trabalho de Sothornvit et al., (2009) que estudaram o efeito do tipo de nanoargila sobre as propriedades físicas e antimicrobianas de filmes compósitos de isolado protéico de soro, e acharam valores mais baixos para resistência à tração, que foram de 1,55 e 3,29 MPa quando usaram cloisite 20A e cloisite 30B, respectivamente. Os resultados de alongação neste trabalho encontram-se dentro da faixa de 29,1 a 51,7% dos valores encontrados pelos mesmos autores.

Na Tabela 4.3, os valores de módulo de elasticidade variaram entre 12,9 e 17,5 MPa, sendo que os valores mais altos foram obtidos no ponto central e os valores menores nos dois primeiros experimentos.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para a variável resistência à tração. Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 4.4 e 4.5. Conforme Gacula e Singh (1984), quando o $F_{\text{calculado}}$ é superior a 5 vezes F_{tabelado} , o modelo é considerado preditivo.

Tabela 4.4 ANOVA do modelo de regressão para resistência à tração de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC Q	5,65	1	0,002
(2) MMT Q	9,31	1	0,001
(3) Glicerol L+Q	6,19	2	0,003
Interação 1*2	0,57	2	0,034
Interação 1*3	0,20	1	0,046
Interação 2*3	0,56	1	0,017
Falta de ajuste	0,09	4	0,3292
Erro puro	0,02	2	
Total	19,98	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadratico; L: Efeito linear.

Tabela 4.5 Verificação da validade estatística do modelo para resistência à tração de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	8,45	8	1,06	106	4,15	20,75
Resíduos	0,08	6	0,01			
Falta de ajuste	0,07	4				
Erro puro	0,007	2				
Total	8,53	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo as Tabelas 4.4 e 4.5, pode-se observar que o modelo foi significativo e preditivo para a resistência à tração de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, assim foi possível representar um modelo estatístico para esta resposta. Apresentando a seguinte equação para resistência à tração (RT) Eq. (4.4).

$$RT = 10,6 - 1,23IPC^2 - 1,59MMT^2 - 0,35G - 1,19G^2 - 0,28IPC MMT - 0,23IPC MMT^2 + 0,23IPC G - 0,37MMT G \quad (4.4)$$

$$R^2 = 0,9914$$

A Figura 4.8 apresenta a superfície de resposta, que permite uma visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, expondo valores de resistência à tração, em função da Montmorilonita e glicerol.

Pode-se observar que nos pontos centrais utilizados para glicerol (30 g/100g de IPC) e uma porcentagem de 0,5% de MMT houve maior resistência à tração do que quando utilizado outras porcentagens de glicerol e MMT, ficando em torno de 10,5 MPa.

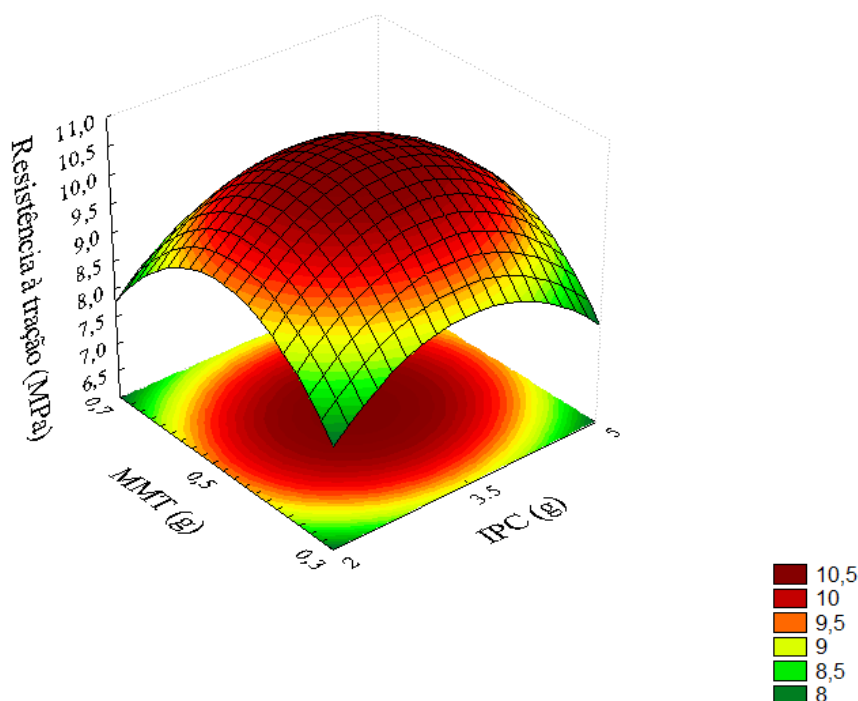


Figura 4.8 Superfície de resposta da resistência à tração dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT em função das concentrações de MMT (%) e glicerol (30 g/100 g de IPC) (concentração de IPC fixa em 3,5 g/100 g).

Com relação aos fatores quadráticos, estes são considerados em um delineamento de planejamento experimental com a finalidade de incrementar a curvatura de uma superfície, de modo a localizar os pontos de máximo e mínimo. Os resultados das análises de variância (ANOVA), ou avaliação do modelo matemático, é feita em função dos valores do F. Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro é 25,54 vezes maior que o segundo, sendo, portanto, este modelo estatisticamente significativo e preditivo.

Um dos fatores mais importantes que afeta sensivelmente as propriedades de tração é o teor de plastificante, especialmente aqueles que mostrarem comportamento hidrofílico, como o glicerol. Sabe-se que os plastificantes provocam alteração nas propriedades mecânicas, fazendo com que tenham maior flexibilidade e menor resistência à tração (ARAUJO-FARRO, 2008).

Comparando os valores deste trabalho com os valores encontrados por Follain et al., (2005) que ao elaborarem filmes de amido de trigo com concentrações de

glicerol de 15, 17, 22 e 30%, mostraram um comportamento típico de decréscimo no valor da tensão na ruptura com o aumento de concentração de glicerol. De acordo com Parris et al., (1995) e Araujo-Farro, (2008) o conteúdo de plastificante (glicerol > sorbitol > polietilenoglicol) é um dos fatores que mais afeta as propriedades de tração dos filmes hidrofílicos.

Os resultados encontrados para resistência à tração no presente trabalho são maiores dos encontrados por Al-Hassan e Norziah, (2012) quando utilizaram mistura de amido com gelatina em diferentes proporções para obtenção de filmes, utilizando glicerol como plastificante (1,28 a 1,70 MPa), e abaixo destes valores quando utilizaram sorbitol como plastificante (10,27 a 18,06 MPa). Isto concordou com Su et al., (2010) que concluíram que o plastificante glicerol é uma molécula de tamanho pequeno que pode penetrar entre as cadeias poliméricas, e enfraquecer a interação entre os polissacarídeos e proteínas como carboximetil celulose e filmes de proteína isolada de soja. Além disso, o aumento da concentração de glicerol em polissacarídeos e/ou proteínas reduz as propriedades mecânicas.

Pode-se mencionar também o trabalho de Mali et al., (2005) que relataram que filmes de fécula de mandioca contendo glicerol afetaram as propriedades mecânicas, resultando em valores de resistência a tração mais baixo, isto foi devido a sua característica higroscópica que tende a fornecer água para a matriz do filme.

Também de acordo com Hoque et al., (2011) os valores de resistência à tração encontrados por eles em filmes de gelatina de pele de sépia (*Sepia pharaonis*) adicionado com diferentes extratos foram maiores (11,64 a 45,63 MPa) do que os valores encontrados no presente trabalho.

Nas Tabelas 4.6 e 4.7 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de avaliar a adequacidade do modelo para a variável alongação (E).

Tabela 4.6 ANOVA do modelo de regressão para alongação de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC α	24,56	1	0,009
(2) MMT α	31,14	1	0,007
(3) Glicerol α	21,34	1	0,010
Falta de ajuste	1,78	9	0,633
Erro puro	0,45	2	
Total	69,11	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático.

Tabela 4.7 Verificação da validade estatística do modelo para alongação de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	66,87	3	22,29	111,45	3,59	17,95
Resíduos	2,23	11	0,20			
Falta de ajuste	1,79	9				
Erro puro	0,45	2				
Total	69,11	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.7, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a alongação de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, assim foi possível predizer um modelo estatístico para esta variável, que apresentou a seguinte equação para alongação (E) Eq. (4.5).

$$E = 45,43 - 2,58IPC^2 - 2,90MMT^2 - 2,40G^2 \quad (4.5)$$

$$R^2 = 0,9677$$

A Figura 4.9 apresenta a superfície de resposta, que permite uma visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, expondo valores de alongação, em função da Montmorilonita e IPC.

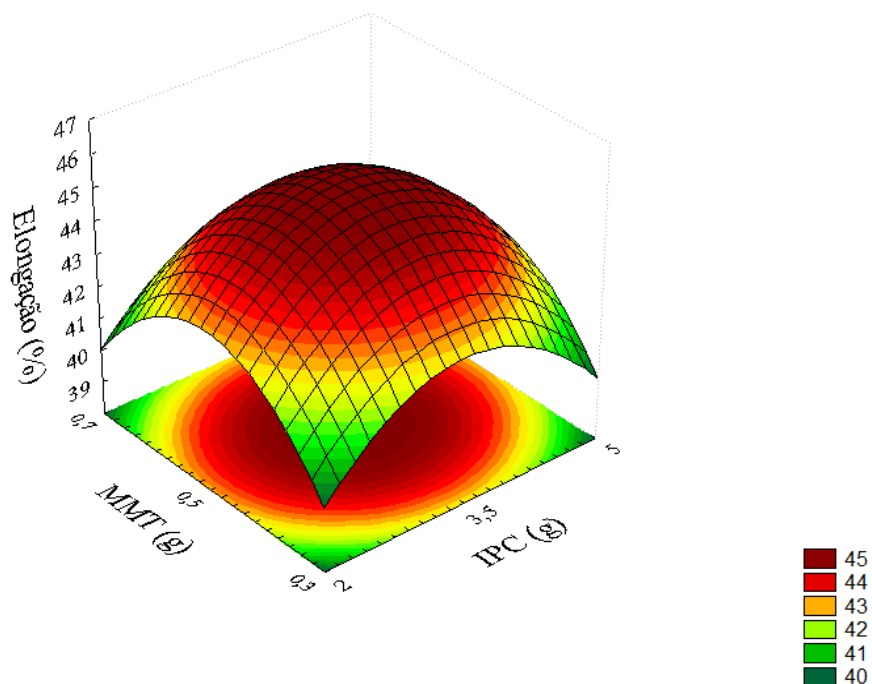


Figura 4.9 Superfície de resposta da alongação dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT em função das concentrações de MMT (%) e IPC (%) (concentração de glicerol fixa em 30 g/100 g de IPC).

Pode-se observar na Figura 4.9 que nos pontos centrais utilizados para as duas variáveis houve maior alongação do que quando utilizado outras porcentagens de IPC e MMT ficando em torno de 45,6%.

Segundo a Tabela 4.3, os valores encontrados para alongação no presente trabalho foram menores que os encontrados por Al-Hassan e Norziah, (2012) quando utilizaram mistura de amido com gelatina em diferentes proporções para obtenção de filmes. Para os valores de módulo de elasticidade os valores encontrados foram menores que os encontrados por Al-Hassan e Norziah, (2012) quando utilizando sorbitol como plastificante encontraram (5,53 a 19,04 MPa) e quando utilizaram glicerol como plastificante (84,14 a 102,31 MPa). Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro foi 31,04 vezes maior que o segundo.

Em geral, a alongação aumenta com o conteúdo de gelatina em filmes plastificados com glicerol, o que indica que nesses filmes a gelatina agiu como plastificante, o que aprimorou flexibilidade do filme e fragilidade reduzida (AL-HASSAN e NORZIAH, 2012) concordando com os valores encontrados no presente trabalho.

A adição de montmorilonita pode aumentar ou diminuir as propriedades mecânicas dependendo da sua porcentagem adicionada em peso de argila. O baixo conteúdo de montmorilonita (5-10% em peso) resultou em um aumento na resistência à tração e no módulo de elasticidade. O maior aumento de montmorilonita (15% em peso) ocorreu um efeito adverso sobre as propriedades mecânicas evidenciando uma diminuição significativa na resistência à tração e módulo de elasticidade (KAMPEERAPPUN et al., 2007).

Nas Tabelas 4.8 e 4.9 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de avaliar a adequacidade do modelo para a variável módulo de elasticidade (ME).

Tabela 4.8 ANOVA do modelo de regressão para módulo de elasticidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC α	12,64	1	0,002
(2) MMT α	23,54	1	0,001
(3) Glicerol α	10,36	1	0,003
Falta de ajuste	2,72	9	0,094
Erro puro	0,06	2	
Total	43,43	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático.

Tabela 4.9 Verificação da validade estatística do modelo para módulo de elasticidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	40,65	3	13,55	54,20	3,59	17,95
Resíduos	2,78	11	0,25			
Falta de ajuste	2,72	9				
Erro puro	0,06	2				
Total	43,43	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.9, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a módulo de elasticidade de filmes nanocompósitos de IPC, assim foi possível predizer um modelo estatístico para esta variável. Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro é 15,09 vezes maior que o segundo. Apresentando a seguinte equação para módulo de elasticidade (ME) Eq. (4.6).

$$ME = 17,40 - 1,85IPC^2 - 2,52MMT^2 - 1,68G^2 \quad (4.6)$$

$$R^2 = 0,9361$$

Os valores encontrados para o módulo de elasticidade no presente trabalho variaram entre 12,9 e 17,5 MPa sendo que os valores mais altos do módulo de elasticidade foram obtidos no ponto central. Estes resultados concordam com Tápia-Blácido et al., (2005) que encontraram valores entre 0,3 e 93,8 MPa para módulo de elasticidade em filmes à base de farinha de amaranto (*Amaranthus caudatus*).

Huang e Yu (2006), trabalharam com as propriedades de filmes nanocompósitos de amido/MMT, preparado com amido de milho termoplástico e MMT ativado pelo método de intercalação utilizando uma extrusora com diferentes concentrações de nanopartículas de 0-11% para o amido. Os resultados do módulo de elasticidade indicaram um aumento com adição do conteúdo da nanopartícula de até 8%.

Os valores encontrados para módulo de elasticidade no presente trabalho foram encontrados dentro da faixa de valores encontrados por McGlashan e Halley, (2003) que acharam um aumento marcadamente a partir de 17 até 65 Mpa, quando utilizaram 0% e 5% de argila, respectivamente, em nanocompósitos amido/poliéster, melhorando assim suas propriedades mecânicas. Dean e Yu, (2005) desenvolveram filmes nanocompósitos à base de proteínas de soja e testaram sua microestrutura e propriedades mecânicas. Eles prepararam o filme nanocompósito de mistura de água com glicerol e adicionado cloisite Na⁺ e, em seguida, tratados com ultra-som por uma hora. A suspensão de cloisite Na⁺ foi misturada com isolado protéico de soja, utilizando um misturador de alta velocidade, então extrusado em extrusora de rosca dupla a 140 °C. Os resultados mostraram que a melhoria mais significativa foi no módulo de elasticidade.

Nas Tabelas 4.10 e 4.11 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), para testar a adequacidade do modelo para a variável força na ruptura (FR).

Tabela 4.10 ANOVA do modelo de regressão para força na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC L+Q	8,38	2	0,002
(2) MMT L+Q	6,01	2	0,003
(3) Glicerol Q	0,28	1	0,033
Interação 1*2	3,45	2	0,005
Falta de ajuste	0,53	5	0,089
Erro puro	0,02	2	
Total	16,75	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático; L: Efeito linear.

Tabela 4.11 Verificação da validade estatística do modelo para força na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	16,20	7	2,32	29,68	3,79	18,95
Resíduos	0,55	7	0,08			
Falta de ajuste	0,53	5				
Erro puro	0,02	2				
Total	16,75	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.11, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a força na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC, assim foi possível prever um modelo estatístico para esta variável. Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro é 7,83 vezes maior que o segundo. Apresentando a seguinte equação para força na ruptura (FR) Eq. (4.7).

$$\begin{aligned} \text{FR} = & 9,6 + 0,50\text{IPC} - 1,43\text{IPC}^2 - 0,18\text{MMT} - 1,25\text{MMT}^2 - 0,28\text{G}^2 + \\ & 0,23\text{IPC MMT} - 1,28\text{IPC MMT}^2 \end{aligned} \quad (4.7)$$

$$R^2 = 0,9675$$

A Figura 4.10 apresenta a superfície de resposta, que permite uma visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC, expondo valores de força na ruptura, em função da Montmorilonita e IPC.

Pode-se observar na Figura 4.10 que nos pontos centrais utilizados para as duas variáveis houve maior força na ruptura, do que quando utilizadas outras porcentagens de IPC e MMT, ficando estes em torno de 9,6 N.

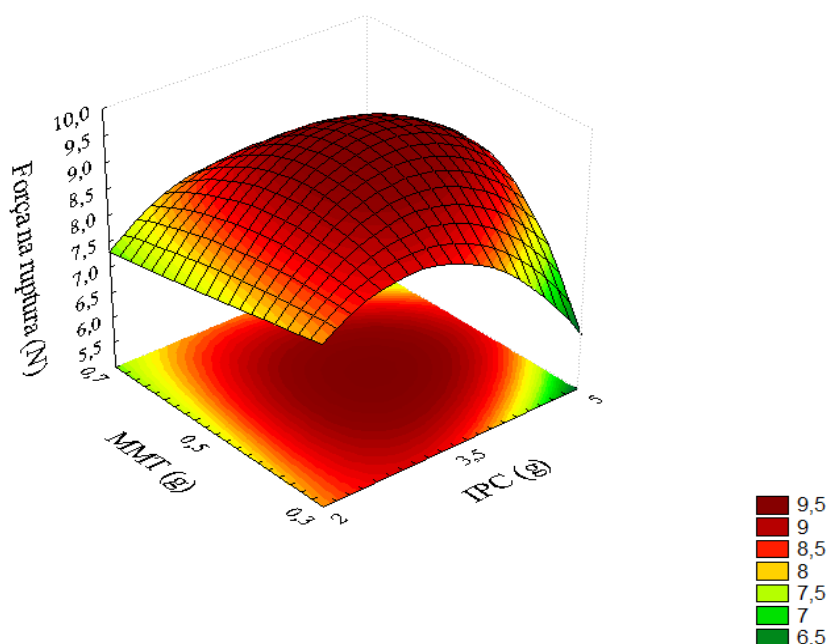


Figura 4.10 Superfície de resposta da força na ruptura (N) dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT em função das concentrações de MMT (%) e IPC (%) (concentração de glicerol fixa em 30 g/100 g de IPC).

Nas Tabelas 4.12 e 4.13 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de avaliar a adequacidade do modelo para a variável deformação na ruptura (DR).

Tabela 4.12 ANOVA do modelo de regressão para deformação na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC L+Q	5,80	2	0,001
(2) MMT L+Q	9,33	2	0,001
(3) Glicerol Q	0,30	1	0,011
Interação 1*2	2,07	2	0,003
Interação 1*3	0,24	2	0,027
Interação 2*3	0,20	1	0,016
Falta de ajuste	0,27	2	0,024
Erro puro	0,01	2	
Total	17,12	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático; L: Efeito linear.

Tabela 4.13 Verificação da validade estatística do modelo para deformação na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	16,85	10	1,69	24,14	5,96	29,80
Resíduos	0,27	4	0,07			
Falta de ajuste	0,27	2				
Erro puro	0,006	2				
Total	17,12	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.13, podemos observar que o modelo foi significativo e não foi preditivo para a deformação na ruptura de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, assim não foi possível prever um modelo estatístico para esta variável, porque o F calculado foi menor em 5 vezes o F tabelado.

Como pode ser observado na Tabela 4.12, a concentração de MMT apresentou maior efeito linear e quadrático no valor de deformação na ruptura. Já a concentração de glicerol apresentou menor efeito quadrático. As interações entre IPC e MMT; IPC e glicerol; e MMT e glicerol foram significativas.

Os valores encontrados para força na ruptura e deformação na ruptura no presente trabalho variaram entre 6,1 - 9,7 N e 7,3 - 10,8% respectivamente, sendo que os valores mais altos de força na ruptura e deformação na ruptura foram obtidos no ponto central. Estes resultados concordam com Tápia-Blácido et al., (2005) que encontraram valores entre 0,8 - 4,3 N para força na ruptura e 3,4 - 37,2% para deformação na ruptura em filmes à base de farinha de amaranto (*Amaranthus caudatus*). Estes resultados também concordam com Araujo-Farro et al., (2010) que encontraram valores entre 3,50 - 7,99 N para força na ruptura e 0,81 - 10,93% para deformação na ruptura em filmes de amido de quinoa.

Neste trabalho, foram encontrados resultados de força na ruptura semelhantes com os encontrados por Elizondo et al., (2009) que desenvolveram filmes biodegradáveis à base de misturas de farinha de *Amaranthus cruentus* e poli (álcool

vinílico) achando valores na faixa de 9,4 N. Estes mesmos autores acharam valores de 16, 3% para deformação na ruptura.

A Tabela 4.14 apresenta a planilha do planejamento experimental de Box e Behnken, e os resultados de espessura, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e transparência dos filmes nanocompósitos de IPC.

Tabela 4.14 Delineamento experimental de Box e Behnken e resultados de espessura, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e transparência dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variáveis Independentes				Testes*			
T	IPC (g)	MMT (g)	Glicerol (%)	U (%)	S (%)	PVA**	TRA
1	5	0,7	30	14,8±0,2	27,6±0,1	5,4±0,2	8,4±0,1
2	5	0,3	30	14,9±0,1	26,2±0,3	5,2±0,1	9,1±0,2
3	2	0,7	30	14,5±0,2	20,3±0,1	5,0±0,1	9,3±0,1
4	2	0,7	30	14,4±0,1	20,7±0,2	4,6±0,2	8,9±0,1
5	5	0,7	35	18,1±0,1	26,8±0,2	5,5±0,2	7,9±0,2
6	5	0,7	25	13,6±0,2	20,4±0,3	4,2±0,3	10,8±0,1
7	2	0,5	35	17,8±0,2	24,7±0,1	4,7±0,1	8,6±0,1
8	2	0,5	25	18,2±0,1	19,5±0,1	3,9±0,1	12,6±0,1
9	3,5	0,7	35	14,1±0,1	26,8±0,1	4,1±0,1	11,8±0,1
10	3,5	0,7	25	14,2±0,1	19,1±0,2	3,7±0,2	12,1±0,2
11	3,5	0,3	35	17,9±0,2	26,1±0,2	4,6±0,2	8,7±0,2
12	3,5	0,3	25	13,8±0,1	18,1±0,3	3,8±0,3	12,3±0,2
13	3,5	0,5	30	16,1±0,1	18,6±0,2	3,2±0,1	13,0±0,2
14	3,5	0,5	30	16,2±0,1	18,4±0,1	3,2±0,2	12,7±0,1
15	3,5	0,5	30	16,2±0,2	18,3±0,1	3,3±0,1	13,1±0,1

*Média de 3 repetições ± desvio padrão. Onde: T: Tratamentos, IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita, U: Umidade, S: Solubilidade, PVA: Permeabilidade ao vapor de água $^{**}(g\ mm\ m^{-2}\ d^{-1}\ KPa^{-1})$., TRA.: Transparência.

Nas Tabelas 4.15 e 4.16 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de avaliar a adequacidade do modelo para a variável umidade (U).

Tabela 4.15 ANOVA do modelo de regressão para umidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC L+Q	0,52	2	0,012
(2) MMT L+Q	11,51	2	0,001
(3) Glicerol L+Q	9,34	2	0,001
Interação 1*2	4,69	2	0,001
Interação 1*3	6,0	1	0,001
Interação 2*3	4,41	1	0,001
Falta de ajuste	0,01	2	0,372
Erro puro	0,01	2	
Total	39,29	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático; L: Efeito linear.

Tabela 4.16 Verificação da validade estatística do modelo para umidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{tab}	$F_{tab \times 5}$
Regressão	39,25	10	3,93	393,10	5,96	29,8
Resíduos	0,02	4	0,01			
Falta de ajuste	0,01	2				
Erro puro	0,01	2				
Total	39,29	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.16, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a umidade de filmes nanocompósitos de IPC, assim foi possível predizer um modelo estatístico para esta variável. Comparando os valores de $F_{calculado}$ com o $F_{tabelado}$, verifica-se que o primeiro é 65,94 vezes maior que o segundo. Isto apresentou a seguinte equação para umidade (U) Eq. (4.8).

$$U = 16,17 - 1,08IPC + 0,20IPC^2 - 0,85MMT - 1,72MMT^2 + 1,01G + 0,55G^2 + 1,28IPC MMT^2 + 0,85IPC^2 MMT + 1,22IPC G - 1,05MMT G \quad (4.8)$$

$$R^2 = 0,9995$$

Os valores encontrados para umidade no presente trabalho variaram entre 13,6 e 18,2%. Estes resultados estão acima dos valores encontrados por Araujo-Farro, (2008) que acharam valores entre 9,81 e 11,82% em filmes biodegradáveis desenvolvidos a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow).

Nas Tabelas 4.17 e 4.18 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de avaliar a adequacidade do modelo para a variável solubilidade (S).

Tabela 4.17 ANOVA do modelo de regressão para solubilidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC L+Q	69,76	2	0,001
(2) MMT L+Q	23,45	2	0,001
(3) Glicerol L+Q	85,36	2	0,001
Interação 1*2	12,82	2	0,003
Interação 1*3	2,10	1	0,011
Falta de ajuste	0,44	3	0,139
Erro puro	0,05	2	
Total	193,98	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático; L: Efeito linear.

Tabela 4.18 Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	193,74	9	21,53	215,3	4,77	23,85
Resíduos	0,49	5	0,10			
Falta de ajuste	0,44	3				
Erro puro	0,05	2				
Total	194,72	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.18, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a solubilidade de filmes nanocompósitos de IPC, assim foi possível prever um modelo estatístico para esta variável. Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro é 45,14 vezes maior que o segundo. Apresentando a seguinte equação para solubilidade (S) Eq. (4.9).

$$S = 18,43 + 0,75IPC + 2,79IPC^2 + 0,34MMT + 2,47MMT^2 + 3,93G + 1,62G^2 + 0,45IPC \text{ MMT} + 2,45IPC \text{ MMT}^2 - 1,03IPC^2 G \quad (4.9)$$

$$R^2 = 0,9975$$

A Figura 4.11 apresenta a superfície de resposta, que permite uma visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, expondo valores de solubilidade, em função do glicerol e IPC.

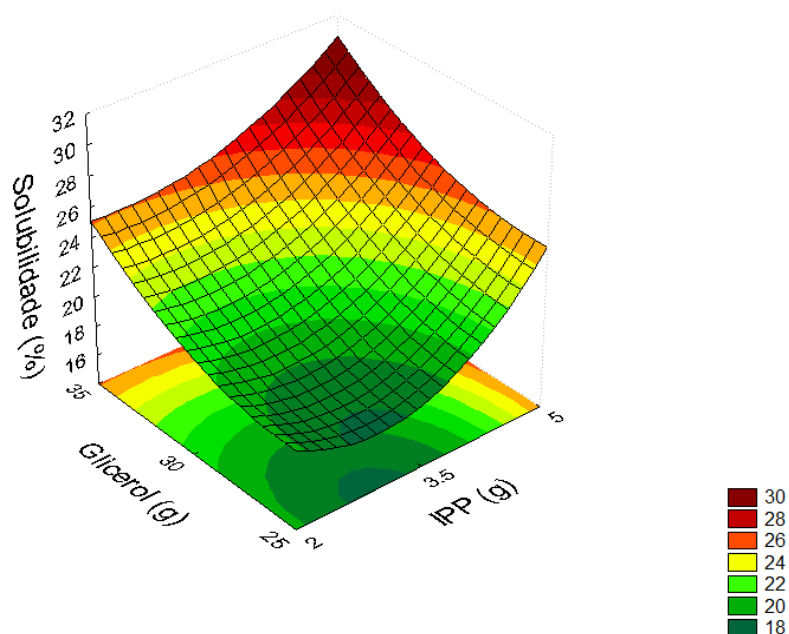


Figura 4.11 Superfície de resposta da solubilidade dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT, em função das concentrações de glicerol (30 g/100 g de IPC) e IPP (concentração de MMT fixa em 0,5%).

Pode-se observar na Figura 4.11 que nos pontos centrais utilizados para as duas variáveis houve maior solubilidade do que quando utilizado outras porcentagens de glicerol e IPP ficando em torno de 27,6%.

Como mostrado pela superfície de resposta (Figura 4.11 e Tabela 4.17) a solubilidade dos filmes foi influenciada pelo efeito linear da concentração do glicerol, e pelos efeitos de interação entre o IPP e glicerol. Com relação aos fatores quadráticos, estes se mostraram significativos e positivos, indicando a presença de uma região de valores mínimos. A solubilidade será tanto maior quanto maior for o valor do nível do glicerol utilizado na solução filmogênica. O efeito do teor do glicerol pode ser explicado devido ao caráter hidrofílico do plastificante (ARAUJO-FARRO et al., 2010).

Segundo a Tabela 4.14 os valores encontrados para solubilidade no presente trabalho estão acima dos encontrados por Araujo-Farro, (2008) que acharam valores de 18% de solubilidade em filmes biodegradáveis desenvolvidos a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow). Já Mali, (2002) achou valores de solubilidade média de 25% em filmes de amido de cará utilizando glicerol como plastificante.

Bourtoom et al., (2006) avaliaram o efeito do tipo de plastificante e concentração nas propriedades de filme comestível obtidos a partir de proteínas solúveis em água de surimi de pescado. Estes autores concluíram que filmes plastificados com sorbitol, mostraram maior solubilidade em comparação com filmes plastificados com glicerol e polietileno glicol. O aumento da concentração do plastificante, em geral, resultou em filmes mais solúveis, os valores apresentaram em torno de 55% de solubilidade, estando acima dos resultados encontrados no presente trabalho.

Hendrix et al., (2012) desenvolveram filmes biopoliméricos à base de farinha desengordurada de mostarda tratados por homogeneização de alta pressão, ultra-som e irradiação gama encontrando valores entre (30,7 – 34,1%), (31,4 – 31,8%) e (30,3 – 34,4%) de solubilidade, respectivamente. Estes valores se encontram acima dos encontrados no presente trabalho.

Nas Tabelas 4.19 e 4.20 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para a variável permeabilidade ao vapor de água (PVA).

Tabela 4.19 ANOVA do modelo de regressão para permeabilidade ao vapor de água de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC L+Q	5,61	2	0,001
(2) MMT Q	1,54	1	0,002
(3) Glicerol L+Q	1,57	2	0,004
Interação 1*2	0,16	1	0,020
Interação 1*3	0,16	2	0,039
Falta de ajuste	0,07	4	0,168
Erro puro	0,01	2	
Total	9,12	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático; L: Efeito linear.

Tabela 4.20 Verificação da validade estatística do modelo para permeabilidade ao vapor de água de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	8,45	8	1,06	106	5,96	29,8
Resíduos	0,08	6	0,01			
Falta de ajuste	0,07	4				
Erro puro	0,01	2				
Total	8,61	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.20, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a permeabilidade ao vapor de água de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, assim foi possível predizer um modelo estatístico para esta variável. Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro é 25,54 vezes maior que o segundo. Apresentando a seguinte equação para permeabilidade ao vapor de água (PVA) Eq. (4.10).

$$\text{PVA} = 3,23 + 0,26\text{IPC} + 1,17\text{IPC}^2 + 0,65\text{MMT} + 0,30\text{G} + 0,17\text{G}^2 + 0,15\text{IPC}^2 \text{ MMT} + 0,13\text{IPC} \text{ G} + 0,23\text{IPC}^2 \text{ G} \quad (4.10)$$

$$R^2 = 0,9827$$

A Figura 4.12 apresenta a superfície de resposta, que permitiu uma visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, expondo valores de permeabilidade ao vapor de água, em função da concentração de MMT e concentração de IPC.

Pode-se observar na Figura 4.12 que nos pontos centrais utilizados para as duas variáveis houve menor permeabilidade ao vapor de água do que quando utilizado outras porcentagens de IPC e MMT ficando em torno de $3,2 \text{ g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ KPa}^{-1}$.

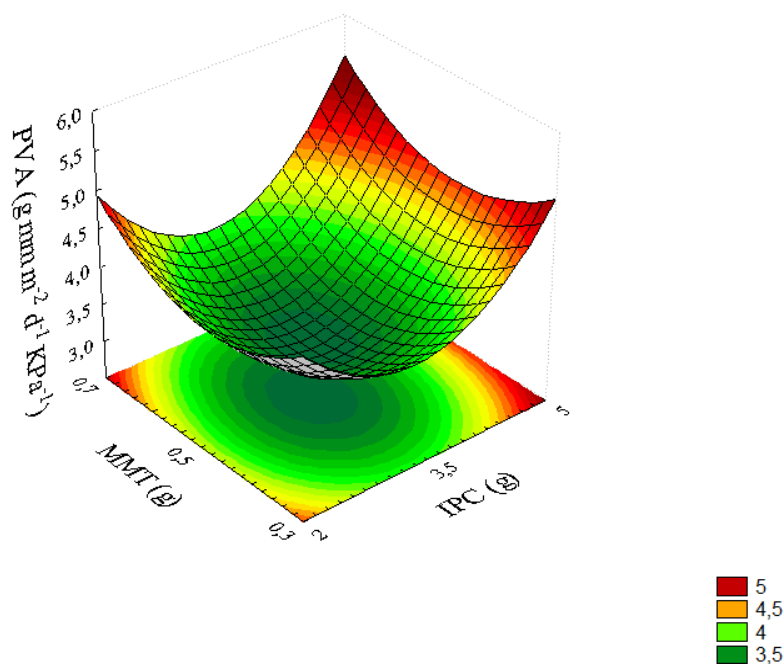


Figura 4.12 Superfície de resposta da permeabilidade ao vapor de água dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT em função das concentrações de MMT (%) e IPC (%) (concentração de glicerol fixa em 30 g/100g de IPC).

Como mostrado na Tabela 4.19, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes foi influenciada pelo efeito linear da concentração de IPC e pela concentração do glicerol, e pelos efeitos de interação entre o IPC e glicerol e efeito de interação entre IPC e MMT. Com relação aos fatores quadráticos, estes se mostraram significativos e positivos.

Os valores encontrados para PVA no presente trabalho encontram-se acima dos valores encontrados por Souza et al., (2011) que avaliaram filmes formados a partir de polissacarídeos, como quitosana, incorporados com diferentes frações de lipídeos encontrando valores entre $(1,32 - 1,80 \text{ g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ KPa}^{-1})$ e na faixa dos valores encontrados pelos mesmos autores quando avaliaram filmes de quitosana pura $(3,8 \text{ g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ KPa}^{-1})$. Sendo estes valores ótimos.

De acordo com Hendrix et al., (2012) ao avaliar filmes biopoliméricos à base de farinha desengordurada de mostarda tratados por homogeneização de alta pressão, ultra-som e irradiação gama encontraram valores para PVA entre $(3,40 - 4,67)$, $(4,43 - 4,96)$ e $(0,5 - 2,0 \text{ g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ KPa}^{-1})$ respectivamente, estando estes valores acima dos encontrados no presente trabalho.

A estrutura em camadas de nano-argilas impede a transmissão de vapor de água através da matriz do filme ou atrasos à difusão de vapor de água devido à tortuosidade das vias (BHARADWAJ, 2001; PARK et al., 2003; SORRENTINO et al., 2006). A diminuição da PVA de filmes de argila/nanocompósitos tem sido freqüentemente observado com filmes de diversos biopolímeros, tais como acetato de celulose/Cloisite 30B (PARK et al., 2004), filmes nanocompósito de quitosana/Cloisite Na⁺ (RHIM et al., 2006), e isolado protéico de soja/argilas (RHIM et al., 2005).

De acordo com Bourtoom et al., (2006) a permeabilidade ao vapor de água em filmes de proteínas solúveis de surimi de pescado, aumentou com o incremento na quantidade de plastificante nos filmes. A PVA aumentou de 30,41 para 79,96, 125,80 para 234,67 e 89,52 para 225,45 g mm m⁻² d⁻¹ KPa⁻¹ quando a concentração de sorbitol, glicerol e polietileno glicol aumentou de 25% para 75% respectivamente. Esta tendência poderia ser explicada por modificações estruturais da rede de proteínas, os valores encontrados por estes autores para PVA estão muito acima dos valores encontrados no presente trabalho que foi de 3,2 e 5,5 g mm m⁻² d⁻¹ KPa⁻¹, valores ótimos como barreira de vapor de água.

Nas Tabelas 4.21 e 4.22 são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para a variável transparência (TRA).

Tabela 4.21 ANOVA do modelo de regressão para transparência de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Variável	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	p
(1) IPC α	25,19	1	0,002
(2) MMT α	6,81	1	0,006
(3) Glicerol L	15,66	1	0,003
Interação 1*3	1,12	1	0,036
Interação 2*3	2,72	1	0,015
Falta de ajuste	4,82	7	0,061
Erro puro	0,09	2	
Total	56,43	14	

* $p < 0,05$ indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita; Q: Efeito quadrático; L: Efeito linear.

Tabela 4.22 Verificação da validade estatística do modelo para transparência de filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{cal}	F _{tab}	F _{tabx5}
Regressão	48,70	5	9,74	18,04	3,48	17,4
Resíduos	4,90	9	0,54			
Falta de ajuste	4,82	7				
Erro puro	0,09	2				
Total	58,51	14				

Onde: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Quadrado médio; F: Fisher.

Segundo a Tabela 4.22, podemos observar que o modelo foi significativo e preditivo para a transparência de filmes nanocompósitos de IPC e MMT, assim foi possível prever um modelo estatístico para esta variável. Comparando os valores de $F_{\text{calculado}}$ com o F_{tabelado} , verifica-se que o primeiro é 5,18 vezes maior que o segundo. Apresentando a seguinte equação para transparência (TRA) Eq. (4.11).

$$\text{TRA} = 12,73 - 2,60\text{IPC}^2 - 1,35\text{MMT}^2 - 0,97\text{G} + 0,55\text{G}^2 - 0,75\text{IPC}^2 \text{G} + 0,82\text{MMT} \text{G} \quad (4.11)$$

$$R^2 = 0,9085$$

Os valores encontrados para transparência no presente trabalho foram ótimos encontrando-se abaixo dos valores encontrados por Souza, (2011) que avaliou filmes formados a partir de quitosana, com incorporação de óleo de carpa encontrando valores entre (30,19 – 38,76) e valores encontrados para filmes de quitosana pura (43,2).

Sothornvit et al., (2009) estudaram o efeito do tipo de nanoargila sobre as propriedades físicas e antimicrobianas de filmes compósitos de isolado protéico de soro e acharam valores mais baixos para transparência quando usaram cloisite 30B (6,30). Quando usaram cloisite Na⁺, cloisite 20A e filme puro de isolado protéico puro,

encontraram valores de 10; 10,19 e 14,38 respectivamente, estando estes resultados na faixa dos resultados obtidos no presente trabalho.

Sothornvit et al., (2010) avaliaram filmes compósitos à base de isolado protéico de soro/cloisite 30B com diferentes quantidades da argila (0, 5, 10 e 20 g/100 g IPS) e acharam valores de transparência de 14, 38; 6,30; 4,89 e 4,22 respectivamente, quando foram usadas concentrações de argila os valores foram mais baixos que os encontrados no presente trabalho. Estes autores concluíram que com o aumento de concentração de argila houve uma diminuição na transparência dos filmes.

Os valores encontrados para transparência no presente trabalho estão acima dos encontrados por Al-Hassan e Norziah, (2012) quando utilizaram mistura de amido com gelatina em diferentes proporções para obtenção de filmes, utilizando sorbitol e glicerol como plastificante achando valores de 0,86 a 1,60 e 1,85 a 2,12 respectivamente.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para melhor elucidar a relação entre as características de superfície e as propriedades (permeabilidade ao vapor de água, resistência a tração e alongação na ruptura) dos filmes, microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para examinar as superfícies dos mesmos.

A Figura 4.13(a) apresenta a fotomicrografia do filme de isolado protéico puro plastificado com glicerol, mostrando a superfície do filme, sem adição de MMT. A Figura 4.13 (b), correspondente ao filme nanocompósito de IPC e MMT mostrando a estrutura interna da matriz do filme.

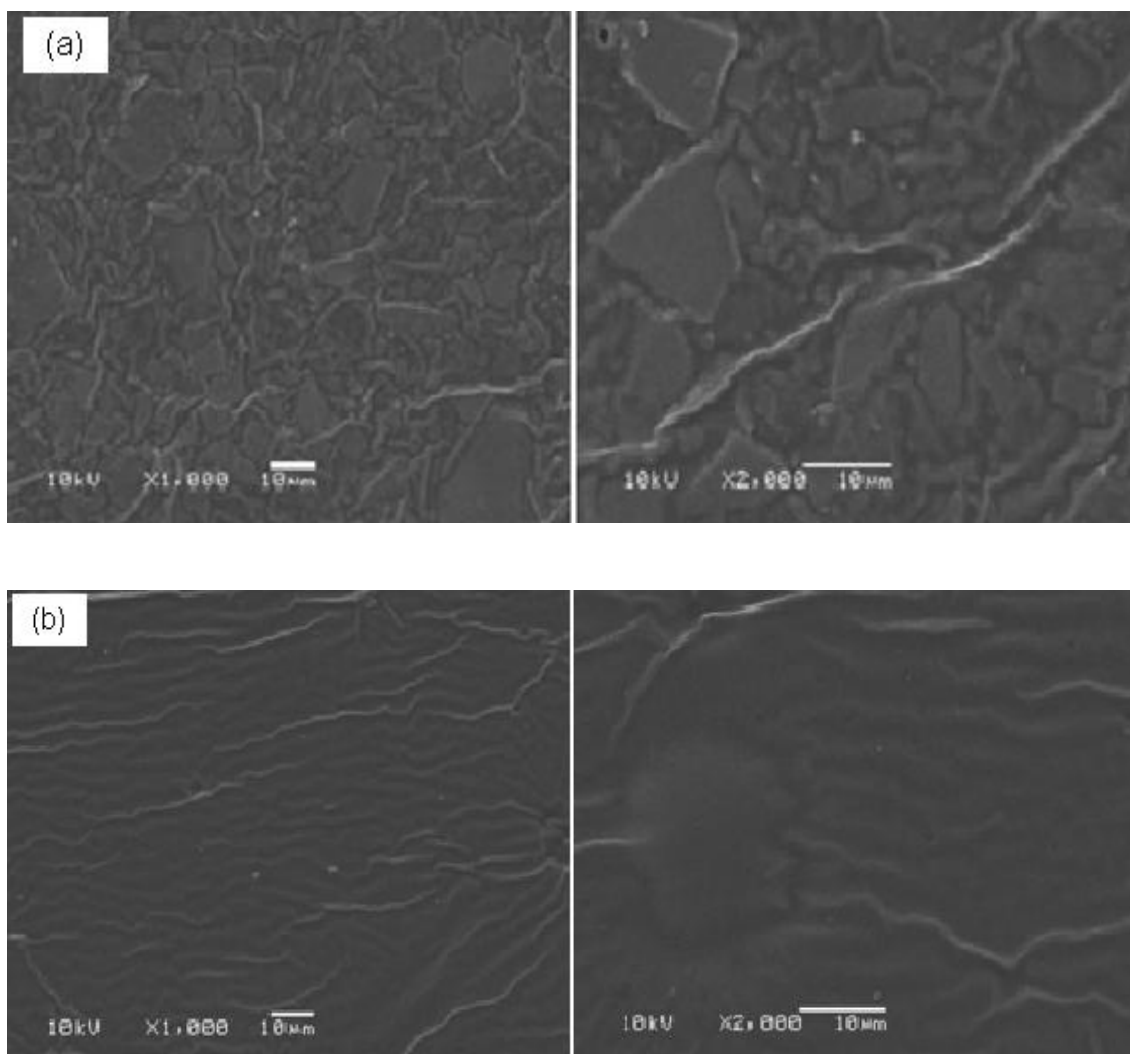


Figura 4.13 (a) Fotomicrografia eletrônica de varredura do filme de isolado protéico de corvina puro plastificado com glicerol, mostrando a superfície do filme. **(b)** correspondente ao filme nanocompósito de IPC e MMT mostrando a estrutura interna da matriz do filme. Foi utilizada uma ampliação de X1000 e X2000 respectivamente.

Conforme as fotomicrografias de superfície apresentadas na Figura 4.13, o filme de isolado protéico puro plastificado com glicerol (Figura 4.13a) apresenta-se livre de bolhas de ar, possuindo uma superfície homogênea, com estrutura granulada e porosa, apresentando irregularidades na superfície. Essas imperfeições possivelmente facilitaram a difusão do vapor de água, o que explica a maior PVA ($8,72 \text{ mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ KPa}^{-1}$) desse filme. A Figura 4.13b mostra que os filmes nanocompósitos de IPC e MMT apresentaram uma superfície lisa e contínua, sem estrutura granulada e

porosa, mínimas irregularidades na superfície, no entanto, não o suficiente para facilitar a difusão do vapor de água nas cadeias poliméricas.

Nos filmes nanocompósitos de IPC e MMT, não há presença de filamentos rugosos grosseiros, bolhas ou rachaduras internas o que pode ser um indicativo de melhor interação entre os polímeros e a MMT, influenciando positivamente para o bom desempenho das propriedades mecânicas dos filmes. Concordando com Souza et al., (2011) que avaliaram filmes formados a partir de polissacarídeos, como quitosana, incorporados com diferentes frações de lipídios, estes autores encontraram nas micrografias de superfície apresentadas que o filme de quitosana pura estava livre de bolhas de ar, possuindo uma superfície lisa e contínua, sem estrutura granulada e porosa. Já os filmes compostos com óleo apresentaram certas irregularidades na superfície, no entanto, sem aumentar a permeabilidade ao vapor de água.

Melhores resultados foram obtidos quando comparado com Liu et al., (2007) que trabalharam com filmes de pectina com a adição de dois diferentes tipos de proteínas (gelatina de pele de peixe e proteína de soja), e obtiveram filmes à base de pectina com superfícies relativamente suaves do que os filmes com adição de proteínas que foram ásperos, densos e frágeis na aparência da superfícies com algumas partículas irregulares distribuída uniformemente na fase da pectina.

Al-Hassan e Norziah, (2012) quando utilizaram mistura de amido com gelatina em diferentes proporções para obtenção de filmes, utilizando sorbitol e glicerol como plastificante, observaram em filmes plastificados com glicerol superfícies mais ásperas com a presença de poros ou cavidades que pode estar relacionado à formação de canais nos filmes, enquanto que filmes plastificados com sorbitol mostram uma superfície mais homogênea e compacta. No entanto, superfícies mais lisas foram observadas em ambos os filmes com glicerol e sorbitol que tem menos conteúdo de proteína. Concordando com Kampeerappun et al., (2007) que na preparação de filme compósito de amido de mandioca/montmorilonita evidenciaram na microscopia eletrônica de varredura que o tamanho mais fino das partículas de argila foi obtido no caso de filme compósito contendo quitosana, os resultados indicaram que a quitosana, devido à sua hidrofiliabilidade e capacidade de anexar à superfície da argila teve um papel na compatibilização entre a matriz de amido e montmorilonita.

4.3.4 Análise de espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

Na Figura 4.14 apresenta-se o espectro de absorção comparativo dos filmes, na faixa de $4500 - 500 \text{ cm}^{-1}$. Nesta região, as variações na estrutura da amostras são diferenciadas pela localização do pico de absorção na banda do comprimento de onda característico e pela intensidade da absorção da energia.

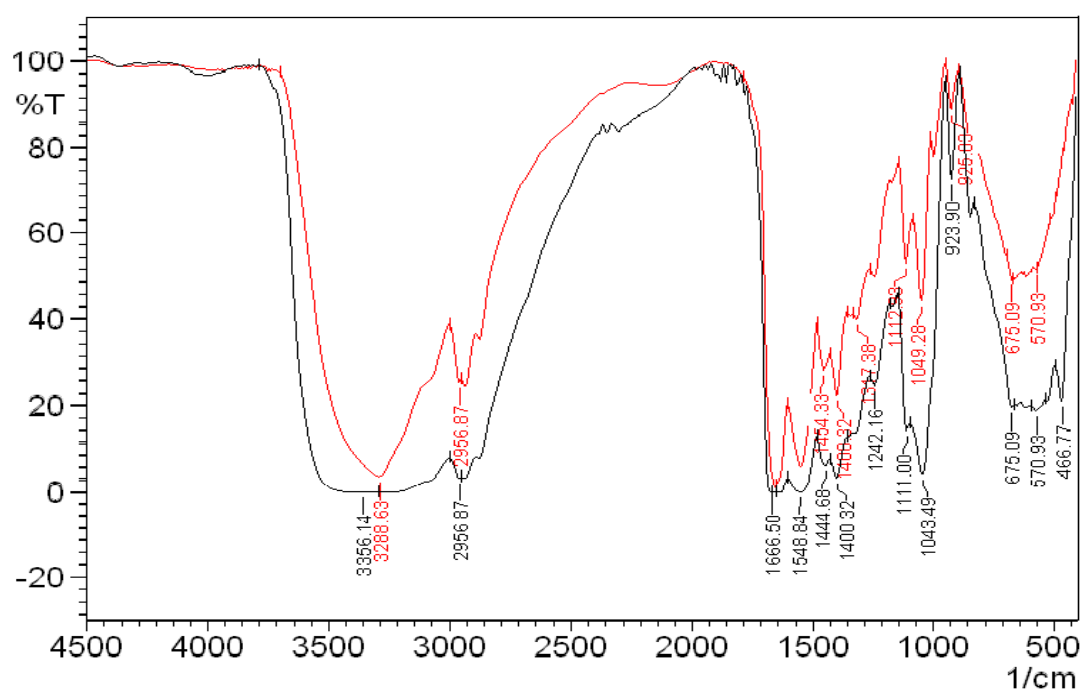


Figura 4.14 Comparação dos espectros de filmes de IPC na faixa de número de onda de $4500 - 500 \text{ cm}^{-1}$. Onde: — Filme nanocompósito de IPC e MMT, — Filme nanocompósito de IPC puro com glicerol.

Os espectros de infravermelho médio dos filmes mostraram que possuem uma estrutura amorfa como consequência do tratamento térmico efetuado sobre a solução filmogênica, e que as propriedades dos filmes estão associadas a bandas de absorbância entre 1600 e 570 cm^{-1} os filmes de IPC e MMT apresentaram mais picos característicos de grupos funcionais.

Neste estudo os espectros de absorção foram utilizados para análise qualitativa e comparativa da estrutura dos biomateriais na faixa de $4500-500 \text{ cm}^{-1}$, sendo focalizada a região do infravermelho médio. Foram comparados os espectros dos filmes (filme nanocompósito de IPC e MMT e filme de IPC puro com glicerol). Como o

tratamento rigoroso das vibrações de moléculas complexas é pouco prático, costuma-se realizar as interpretações a partir de comparações empíricas com outros espectros pela extrapolação de resultados obtidos para o caso de moléculas mais simples.

Comparando os espectros obtidos dos filmes nanocompósitos em relação às frequências características dos grupos funcionais, estas podem variar muito devido às interações complexas, intermoleculares e intramoleculares. As bandas de absorção podem, entretanto, corresponder predominantemente a um único modo vibracional. Certas bandas de absorção, como por exemplo, àquelas provenientes dos modos de deformação axial de C-H, O-H e C=O, permanecem razoavelmente fixos no espectro, independentemente de possíveis interações. A posição exata da banda de absorção revela detalhes importantes da estrutura, assim como as mudanças nos contornos das bandas. As duas áreas mais importantes para o exame preliminar dos espectros são as regiões 4000 a 1300 cm^{-1} (2,5 – 7,7 μm) e 909 a 650 cm^{-1} (11,0 – 15,4 μm). Esta última faixa de menor comprimento de onda (alta energia) é chamada de região dos grupamentos funcionais. Ocorrem nesta região as absorções correspondentes a grupos funcionais importantes tais como OH, NH e C=O. A região intermediária do espectro, 1300 – 909 cm^{-1} (7,7 – 11,0 μm) é conhecida como a região de “impressão digital”. O espectro inclui muitas bandas, é complexo e os modos de vibração são geralmente acoplados. Esta região do espectro é muito importante para a determinação da estrutura, desde que comparada às demais regiões (SILVERSTEIN et al., 1987).

Na Figura 4.14 mostram-se os espectros que abrangem desde o menor comprimento de onda (alta energia) até a impressão digital. Podem-se observar em 3356,14 cm^{-1} e 3288,63 cm^{-1} a sobreposição dos estiramentos axiais de O-H e N-H presentes em proteínas (isolado protéico). Os picos na região de 2956 cm^{-1} são relativos aos estiramentos axiais de C-H. A banda aguda e menos intensa centrada em 1666,50 cm^{-1} , mostra o estiramento da carbonila, proveniente da interação da argila com o isolado protéico. Os picos em 1317,38 e 1242,16 cm^{-1} são relativos à deformação angular simétrica de C-H. O pico na região de 570,93 cm^{-1} pode ser relacionado à deformação angular de N-H presente nos aminoácidos do isolado protéico concordando com os espectros encontrados na literatura (SILVERSTEIN et al., 1987).

4.3.5 Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 4.15 apresenta-se o tipo de estrutura cristalina dos filmes de isolado protéico de corvina com o sem a presença de montmorilonita.

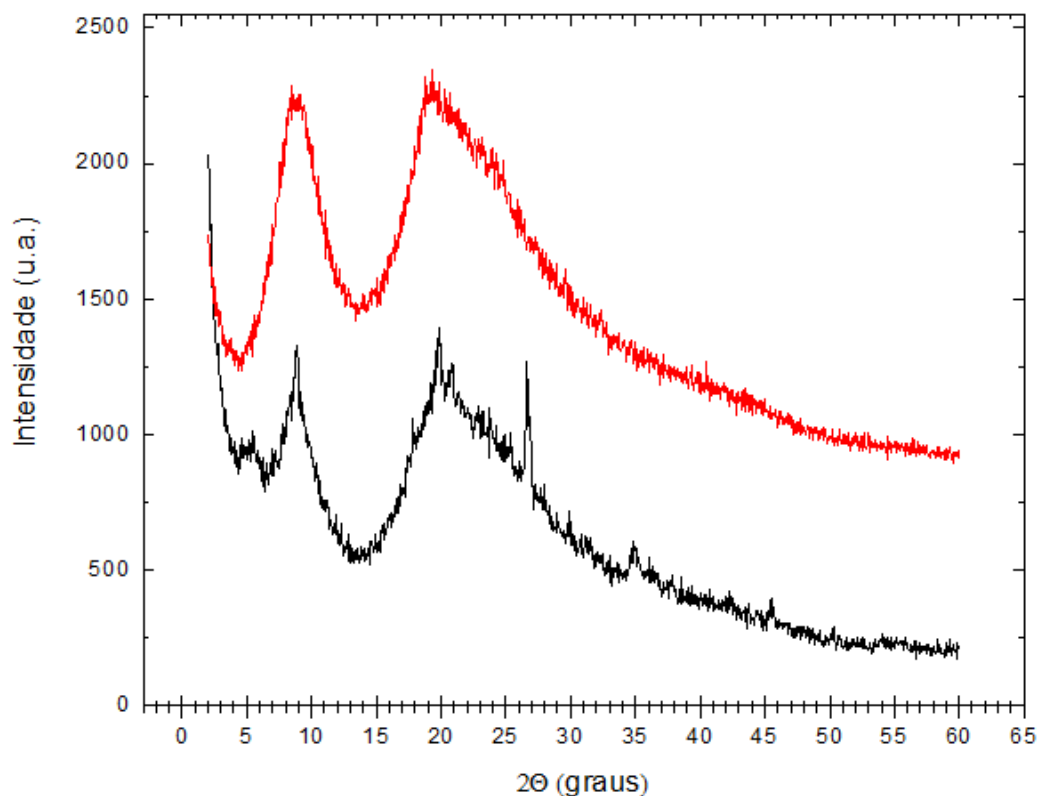


Figura 4.15 Difratoograma de filme de isolado protéico, Onde: — Filme nanocompósito de IPC e MMT, — Filme nanocompósito de IPC puro com glicerol.

Podemos observar na Figura 4.15 que para o filmes de IPC puro predomina uma estrutura de tipo polimérica, predominando uma matriz polimérica sem presença de picos. Para os filmes nanocompósitos de IPC e MMT exibe uma banda larga na região entre $2\theta = 26,9^\circ$ e $2\theta = 50,4^\circ$ as bandas largas observadas nesta região refletem que os filmes apresentaram uma porcentagem muito baixa do grau de cristalinidade.

O padrão de DRX do filme composto também mostra um pico $2\theta = 8,05^\circ$ que corresponde ao espaçamento entre as camadas de silicato intercalar da montmorilonita.

De modo geral, a variação do espaçamento interplanar nos filmes nanocompósitos de IPC e MMT foi entre $D_{001} = 10,38 \text{ \AA}$ e $D_{001} = 1,67 \text{ \AA}$ o que sugere a formação de um nanocompósito com baixo grau de cristalinidade. Valores acima de 5% de MMT na matriz o espaçamento interplanar das montmorilonitas tende a estabilizar ou diminuir (DEAN et al., 2007; BORDES et al., 2009; SANTOS, 2010).

Chivrac et al., (2010) relataram que em filmes nanocompósitos a base de amido plastificado com glicerol e MMT Na, quando o glicerol está presente em concentrações acima de 10% (p/p), fica favorecida a formação de estruturas intercaladas como demonstra o DRX.

CAPÍTULO 5

APLICAÇÃO DE REVESTIMENTO DE ISOLADO PROTÉICO DE CORVINA (*Micropogonias furnieri*) E MONTMORILONITA

5.1 INTRODUÇÃO

A embalagem deve preservar as características físicas, organolépticas, nutricionais e sanitárias dos alimentos durante o período de estocagem, transporte e comercialização. O desenvolvimento de embalagens comestíveis e biodegradáveis tem merecido atenção intensa dos pesquisadores durante as últimas décadas, que vêm estudando novos materiais provenientes de fontes renováveis como alternativa às embalagens plásticas sintéticas (THARANATHAN, 2003).

A demanda por frutos processados é mundial, representando no Brasil um crescimento anual próximo de 20% e o consumo per capita em torno de 1,7%. Nos Estados Unidos da América (EUA) o consumo *per capita* das frutas processadas tem crescido em uma escala de 5% ao ano (SANTANA et al., 2008; ASSIS et al., 2008).

Os frutos processados apresentam diversos problemas técnicos e de preservação, o que os tornam consideravelmente mais perecíveis que os frutos *in natura*. O uso de embalagens protetoras visa controlar a perda de massa excessiva, por meio da transpiração e reduzir a respiração através das trocas gasosas com o meio. Quando esses dois fatores são controlados consegue-se retardar a senescência do produto, aumentando sua vida útil pós-colheita (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Em relação à nomenclatura, a maioria dos pesquisadores usa os termos “filme” e “cobertura” indiscriminadamente. No entanto, a cobertura é uma fina camada de material aplicado que é formada diretamente na superfície do produto, enquanto que o filme é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto (GONTARD e GUILBERT, 1995; KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997).

A aplicação de filmes e coberturas em frutas e vegetais frescos ou minimamente processados reduz o amadurecimento, o escurecimento, a mudança de cor, a perda de aroma, umidade e textura, pois promove uma barreira a gases, vapor d'água, diminuindo as taxas de metabolismo e oxidação (LI e BARTH, 1998).

Filmes produzidos a partir de polímeros naturais não tóxicos têm se firmado como uma nova categoria de materiais de alto potencial, para aplicação como coberturas comestíveis sobre frutos e legumes, principalmente em produtos minimamente processados (ASSIS et al., 2008), e têm chamado a atenção do seguimento de embalagens para a criação de novos mercados no setor e, por

questões de biodegradabilidade (BATISTA et al., 2005). A utilização de filmes e coberturas comestíveis está relacionada com sua capacidade de agir como coadjuvante para promover maior qualidade, estendendo a vida-útil dos produtos e possibilitando a economia com os materiais finais de embalagem (FAKHOURI et al., 2007).

É importante ressaltar que o metabolismo de alimentos minimamente processados continua ativo, aumentando a perecibilidade causada pela ruptura celular, aumentando a respiração, em consequência, reações provocam a mudança de cor, textura, aroma, desenvolvimento microbiano e produção de etileno. Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para reduzir a deterioração de alimentos minimamente processados, como a refrigeração, embalagem em atmosfera modificada, uso de aditivos e coberturas comestíveis (KING e BOLIN, 1989). Segundo Muratore et al., (2005) filmes com permeabilidade adequada podem ser usados para prevenir contaminação microbiana em alimentos frescos.

Várias aplicações de filmes e coberturas biodegradáveis têm sido estudadas como alternativas para prolongar o tempo de armazenamento de produtos frescos e minimamente processados, tais como: emulsão de caseinato e ácido esteárico em cenouras descascadas (AVENA-BUSTILLOS e KROCHTA, 1993); coberturas de celulose em batatas e maçãs descascadas (BALDWIN et al., 1996); coberturas de cera de carnaúba e celulose em manga (BALDWIN et al., 1999); coberturas à base de amidos e gelatina em uvas (FAKHOURI et al., 2007); filmes protéicos à base de soro de leite em maçãs (YOSHIDA e ANTUNES, 2009); coberturas à base de quitosana em maçãs minimamente processadas (QI et al., 2011); cobertura de mandioca em manga minimamente processada (CHIUMARELLI et al., 2011).

O mamão Formosa é um exemplo de produto, cujo consumo é muitas vezes limitado pelo tamanho e a inconveniência do descascamento, fazendo com que a forma processada amplie a sua comercialização, pois permite o consumo nas mais diferentes ocasiões e sua utilização nos diferentes serviços de alimentação (SOUZA e DURIGAN, 2007).

O objetivo deste trabalho foi realizar a aplicação de coberturas de isolado protéico de corvina e argila organofílica em mamão Formosa minimamente processado, bem como avaliar suas propriedades e verificar a eficácia desse tipo de cobertura objetivando aumentar a vida-útil do mamão minimamente processado.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

Foram utilizadas unidades de mamão Formosa adquiridas no comércio local da cidade de Rio Grande/RS. Os frutos foram selecionados quanto ao tamanho, cor e formato alongado. As frutas utilizadas apresentavam um peso médio de aproximadamente 1,5 Kg e estavam no estágio de maturação 3 com 50% a 75% da casca amarela como indicado por Lima et al., (2005) e estavam livres de defeitos fisiológicos e infecções causadas por microrganismos visualmente detectáveis.

As amostras foram transportadas em caixas de isopor até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal de Rio Grande, onde foram armazenadas a 4 ± 1 °C até a realização dos testes com coberturas nanocompósitas para aumento da vida-útil.

5.2.2 Preparo das Amostras

O processamento mínimo do mamão foi realizado à temperatura de 10 ± 1 °C, usando-se utensílios previamente higienizados com solução de cloro orgânico (diclorocianurato), na concentração de 2 g.L^{-1} . Os mamões também foram higienizados com a solução de cloro orgânico a 2 g.L^{-1} , por 10 min. Os operadores estavam devidamente protegidos com luvas, aventais, gorros e máscaras, procurando proteger ao máximo o produto de prováveis contaminações. A matéria-prima foi submetida à remoção manual da casca e sementes, sendo cortada manualmente em pedaços de aproximadamente $2,5 \times 2,5$ cm. Em seguida, os pedaços foram enxaguados com água clorada ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) para eliminar o suco celular extravasado. A água foi drenada em peneiras, e os mamões secos por ventilação por 2-3 min.

A cobertura polimérica foi desenvolvida, inicialmente no preparo de uma dispersão de 35 g de isolado protéico de corvina (IPC) em água destilada em um béquer de 1000 mL, Esta dispersão aquosa foi mantida com agitação suave e constante por 20 min com agitador eixo-hélice (713D, Fisatom, São Paulo, Brasil) a 30 °C em banho ultra-termostático (QUIMIS, modelo 214 D2, São Paulo, Brasil), para hidratação do IPC. Posteriormente à hidratação, ajustou-se o pH da dispersão para 11,2 com adição de NaOH 1 N (Merck) utilizando pHmetro de bancada (modelo Marconi PA 200, São Paulo, Brasil) mantendo-se agitação constante por mais 10 min.

Em seguida, foram adicionados 5 g de montmorilonita (MMT) e a temperatura foi elevada a 80 °C. Após a completa dissolução do IPC e MMT, adicionou-se 10,5 g de glicerol previamente solubilizado em água destilada na temperatura da solução filmogênica (80 °C) mantendo o pH em 11,2. Posteriormente, a solução filmogênica foi colocada em homogeneizador (Ultra-turrax IKA modelo T25, Alemanha) por 5 min. Para a preparação do filme de IPC puro foi realizado o mesmo processo sem adição de argila MMT. O mamão após seco e higienizado foi dividido em 3 lotes. Tratamento 1 (controle), Tratamento 2 (filme de IPC puro), Tratamento 3 (filme de IPC com adição de MMT). Os Tratamentos 2 e 3 foram imersos em uma solução filmogênica por 5 min, em seguida, foram drenados utilizando-se peneiras, e deixados para secar por 2-3 min.

As amostras para cada tratamento foram acondicionadas em embalagem não reciclada de PET – Polietileno Tereftalato, com tampa (SANPACK), cujas medidas externas são de 15,5 x 13,2 x 5,5 cm. O número de pedaços por embalagem foi padronizado e as embalagens foram armazenadas em condições refrigeradas, a 4±1 °C. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema 3 x 7, sendo 3 tratamentos (controle T1 e os revestimentos T2 e T3) e 7 períodos de avaliação (em 0, 1, 3, 5, 7, 9 e 12 dias de armazenamento refrigerado).

5.2.3 Análises físicas, físico-químicas e microbiológicas

Na análise de perda de umidade foi utilizada, de cada grupo de tratamento, uma embalagem com perfurações inferiores para que o líquido proveniente da exudação fosse eliminado durante o armazenamento. As análises físicas e químicas (AOAC, 2000) e microbianas (APHA 2001) foram realizadas em triplicata, a cada 2 dias, durante os 12 dias de armazenamento.

5.2.3.1 Perda de massa

A perda de massa foi obtida relacionando-se a diferença entre o peso inicial do mamão minimamente processado e obtido ao final de cada tempo de armazenamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de massa.

5.2.3.2 Firmeza

As medidas de firmeza foram determinadas utilizando-se um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XT.plus, Surrey, Inglaterra), com ponteira cilíndrica movimentada na velocidade de 4 mm.s^{-1} no pré-teste, 8 mm.s^{-1} no pós-teste, e 2 mm.s^{-1} de teste, até a profundidade de 5 mm. Os resultados foram expressos em Newton (N).

5.2.3.3 Cor

A cor foi avaliada utilizando-se um colorímetro Minolta, (modelo *Chroma Meter* CR400, São Paulo, Brasil) e detecção dos parâmetros: luminosidade, L^* , de 0 (preto) a 100 (branco); cromaticidade, Chroma, onde a^* varia de verde (-60) a vermelho (+60) e b^* de azul (-60) a amarelo (+60).

5.2.3.4 Determinação de pH

O pH foi determinado em suspensão de 20 g de amostra em 100 mL de água destilada, em que se mediu o pH com auxílio de um pH-metro (Marconi modelo PA 200, São Paulo, Brasil) (AOAC, 2000).

5.2.3.5 Acidez Titulável

A acidez titulável foi determinada titulando-se 10 g de amostra homogeneizada com 100 mL de água destilada, usando-se NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico (AOAC, 2000).

5.2.3.6 Sólidos solúveis totais (°Brix)

Os teores de sólidos solúveis totais foram determinados a partir do extrato líquido obtido após a trituração da amostra. Utilizou-se um refratômetro de bancada do (tipo Abbe, São Paulo, Brasil) e os resultados foram expressos em °Brix (AOAC, 2000).

5.2.3.7 Análises Microbiológicas

Realizaram-se testes microbiológicos para a detecção de Psicrófilos, Coliformes totais, Coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, e *Salmonella*, seguindo-se a metodologia recomendada pela APHA (2001).

5.2.4 Análise estatística

Para determinar diferenças, estatisticamente, significativas ($p \leq 0,05$) entre médias, análises de variância e teste de Tukey foram utilizadas, usando o software Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Perda de massa

Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados médios da perda de massa das amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando cobertura nanocompósita de isolado protéico de corvina (IPC) puro e cobertura nanocompósita de IPC e MMT de ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Tabela 5.1 Valores de perda de massa (%) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	$2,03 \pm 0,01^{fA}$	$0,30 \pm 0,01^{fB}$	$0,21 \pm 0,01^{fC}$
1	$2,04 \pm 0,01^{fA}$	$0,30 \pm 0,01^{fB}$	$0,21 \pm 0,01^{fC}$
3	$3,43 \pm 0,01^{eA}$	$1,80 \pm 0,01^{eB}$	$0,84 \pm 0,01^{eC}$
5	$4,47 \pm 0,02^{dA}$	$2,19 \pm 0,02^{dB}$	$1,79 \pm 0,01^{dC}$
7	$5,17 \pm 0,01^{cA}$	$3,01 \pm 0,01^{cB}$	$2,06 \pm 0,02^{cC}$
9	$6,90 \pm 0,01^{bA}$	$4,21 \pm 0,02^{bB}$	$3,32 \pm 0,01^{bC}$
12	$10,83 \pm 0,02^{aA}$	$5,90 \pm 0,01^{aB}$	$5,26 \pm 0,01^{aC}$

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

Na Tabela 5.1, estão apresentadas as perdas de massa, em função dos dias de armazenamento. Nota-se que a amostra controle (T1) apresentou a maior perda de massa ao longo do tempo, chegando ao final com uma perda de massa de 10,83%, valor bem superior ao encontrado para mamão revestido com coberturas de IPC puro e coberturas de IPC com adição de MMT, que obteve uma média de 5,90% e 5,26% respectivamente. A perda de água por transpiração e a senescência natural da fruta foram evitados pelo efeito de barreira exercido pelas coberturas utilizadas. Esta redução na perda de massa é devido à presença da cobertura, que atua como agente

sacrificante, ou seja, a desidratação da cobertura ocorre antes do produto recoberto (KESTER e FENNEMA, 1986; KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997).

Os resultados concordaram com Pereira et al., (2006) que avaliaram a perda de massa de amostras de mamão com casca revestidos com fécula de mandioca em diferentes concentrações por 12 dias de armazenamento. Os resultados desse trabalho mostraram que não houve diferença significativa entre a amostra controle e as revestidas com fécula de mandioca, entretanto o aumento na concentração diminuiu a perda de massa. Os valores variaram de 4,44% (amostra controle) a 3,88% (revestimento de 3% de fécula de mandioca). Cabe ressaltar que os baixos valores encontrados foram influenciados pela presença da casca na fruta íntegra.

Após 12 dias de armazenamento, ao comparar os valores de perda de massa dos mamões recobertos com IPC com e sem montmorilonita em relação ao controle, apresentou diferença significativa entre os 3 tratamentos. Estes resultados foram inferiores aos encontrados por Qi et al., (2011) que estudaram o efeito de coberturas à base de quitosana em maçãs minimamente processadas concluindo que não foram totalmente eficientes na perda de massa, achando valores de perda de massa de 19% para tratamento controle e 15% em maçãs revestidas.

Teixeira et al., (2001) avaliaram a perda de massa de amostras de mamão Formosa minimamente processado, armazenados em diferentes temperaturas por 7 dias. As amostras perderam em média 7,92%, 7,29% e 8,15% do conteúdo inicial quando armazenados a 3 °C, 6 °C e 9 °C, respectivamente. Utilizando uma temperatura média de 4 ± 1 °C, comparou-se este trabalho com os dados obtidos no presente trabalho achando melhores resultados de perda massa após 12 dias de armazenamento.

5.3.2 Firmeza

Na Tabela 5.2 se apresentam os resultados médios da firmeza das amostras de mamão Formosa minimamente processado revestido de coberturas de isolado protéico de corvina com e sem MMT ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Tabela 5.2 Valores de firmeza (N) das amostras de mamão, revestidas com coberturas de IPC com e sem montmorilonita armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	32,40 ± 0,83 ^{aB}	36,45 ± 0,58 ^{aA}	35,18 ± 0,41 ^{aA}
1	32,45 ± 0,83 ^{aB}	36,48 ± 0,58 ^{aA}	35,19 ± 0,41 ^{aA}
3	28,13 ± 0,71 ^{bB}	35,22 ± 0,23 ^{bA}	34,81 ± 0,65 ^{abA}
5	23,34 ± 1,56 ^{cB}	32,30 ± 0,17 ^{cA}	33,53 ± 0,49 ^{bA}
7	16,77 ± 1,23 ^{dB}	30,22 ± 0,32 ^{dA}	31,78 ± 0,81 ^{cA}
9	12,29 ± 0,47 ^{eC}	27,76 ± 0,79 ^{eB}	30,43 ± 0,56 ^{cdA}
12	10,15 ± 0,14 ^{fC}	24,84 ± 0,12 ^{fB}	29,08 ± 0,22 ^{dA}

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p\leq 0,05$). Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

A firmeza das amostras de mamão Formosa minimamente processado foi influenciada pelo tempo de armazenamento e pela aplicação da cobertura pode-se observar que a firmeza do mamão Formosa diminuiu com o tempo, entretanto, o tratamento T1 apresentou menor firmeza. O tratamento T3 obteve menor diminuição da firmeza (29,08 N). Os tratamentos T2 e T3 não apresentaram diferença significativa até o 7º dia de armazenamento. O tratamento T1 apresentou 69,76% de perda de firmeza até o último dia de armazenamento. Já o tratamento T3 apresentou 17,64% de perda de firmeza. Este trabalho foi comparado com o de Tapia et al., (2008) avaliaram a firmeza de amostras de mamão minimamente processado revestidos com goma gelana e alginato. Concordando com os resultados obtidos neste estudo, as amostras revestidas apresentaram maior firmeza que a amostra controle. A diminuição da firmeza pode estar diretamente ligada ao aumento da perda de massa dos cubos de mamão. Peixoto et al., (2008) avaliaram a firmeza de amostras de mamão minimamente processado, submetidas a tratamento com cloreto de cálcio e ácido ascórbico. De acordo com seus resultados, a adição de cloreto de cálcio manteve a firmeza em valores próximos a 30N em 10 dias de armazenamento refrigerado. Entretanto, assim como neste trabalho, houve redução da firmeza na amostra controle ($\cong 15$ N) e na amostra tratada com ácido ascórbico ($\cong 17,5$ N).

5.3.3 Cor

Na Tabela 5.3 se apresentam os valores de luminosidade L^* , Chroma a^* e Chroma b^* , respectivamente, das amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de isolado protéico de corvina com e sem montmorilonita ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Tabela 5.3. Valores de L^* , Chroma a^* , Chroma b^* das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Parâmetros	Tempo (dias)	Tratamentos		
		T1	T2	T3
L^*	0	50,25 ± 0,22 ^{aA}	50,17 ± 0,31 ^{aA}	48,70 ± 0,17 ^{aB}
	1	50,22 ± 0,24 ^{aA}	50,14 ± 0,34 ^{aA}	48,65 ± 0,19 ^{aB}
	3	50,17 ± 0,06 ^{aA}	50,03 ± 0,16 ^{aA}	48,56 ± 0,27 ^{abB}
	5	49,61 ± 0,43 ^{abA}	50,01 ± 0,42 ^{aA}	48,38 ± 0,09 ^{abB}
	7	48,89 ± 0,11 ^{bB}	49,6 ± 0,31 ^{abA}	48,35 ± 0,47 ^{abB}
	9	44,91 ± 0,42 ^{cC}	49,23 ± 0,14 ^{bA}	47,86 ± 0,32 ^{bB}
	12	43,16 ± 0,23 ^{dC}	48,92 ± 0,06 ^{bA}	47,01 ± 0,21 ^{cB}
Chroma a^*	0	27,35 ± 0,11 ^{aB}	30,80 ± 0,07 ^{aA}	30,51 ± 0,36 ^{aA}
	1	27,38 ± 0,12 ^{aB}	30,83 ± 0,07 ^{aA}	30,49 ± 0,38 ^{aA}
	3	25,49 ± 0,17 ^{bC}	29,02 ± 0,07 ^{bB}	30,12 ± 0,19 ^{aA}
	5	24,96 ± 0,31 ^{bB}	28,65 ± 0,27 ^{bA}	28,69 ± 0,40 ^{bA}
	7	23,54 ± 0,35 ^{cB}	28,38 ± 0,15 ^{bA}	28,57 ± 0,11 ^{bA}
	9	21,43 ± 0,09 ^{dB}	26,64 ± 0,22 ^{cA}	27,27 ± 0,43 ^{cA}
	12	19,64 ± 0,23 ^{eC}	23,75 ± 0,62 ^{dB}	25,89 ± 0,49 ^{dA}
Chroma b^*	0	35,01 ± 0,11 ^{aB}	36,66 ± 0,20 ^{aA}	34,51 ± 0,17 ^{aB}
	1	34,99 ± 0,18 ^{aB}	36,67 ± 0,27 ^{aA}	34,50 ± 0,27 ^{aB}
	3	33,64 ± 0,41 ^{bB}	35,58 ± 0,42 ^{bA}	34,01 ± 0,09 ^{aB}
	5	33,60 ± 0,44 ^{bB}	34,65 ± 0,21 ^{bcA}	32,99 ± 0,14 ^{bB}
	7	31,91 ± 0,23 ^{cC}	34,15 ± 0,36 ^{cA}	32,80 ± 0,29 ^{bB}
	9	27,29 ± 0,56 ^{dB}	32,22 ± 0,51 ^{dA}	31,89 ± 0,38 ^{cA}
	12	23,61 ± 0,56 ^{eC}	29,95 ± 0,27 ^{eB}	31,46 ± 0,05 ^{cA}

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

Os valores de luminosidade diminuíram até o último dia de armazenamento para todos os tratamentos. Foi observado no tratamento T1, que apresentou o maior escurecimento (14,06%) em relação às amostras que foram recobertas com IPC. O tratamento T2 apresentou o menor escurecimento no decorrer do tempo de armazenamento (2,43%).

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre o tratamento T1 e T2 até o quinto dia de armazenamento, após esse período apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos. O tratamento com cobertura de IPC e MMT (T3) desde o início das análises apresentou menor luminosidade quando comparado com os outros tratamentos. Estes resultados concordam com o trabalho de Wiley (1994) que observou na coloração da polpa de mamão submetido a diferentes tipos de corte, durante 10 dias de armazenamento, o acréscimo na luminosidade nas metades ($L=58,71$ para $L=61,63$) e estabilidade nas fatias ($L=56,27$ a $L=56,20$), não se observando reações bioquímicas conseqüentes ao contato com enzimas e substratos, ou diferenças atribuíveis à temperatura.

Os valores de Chroma a^* diminuíram até o último dia de armazenamento para todos os tratamentos. Foi observado que o tratamento T1 apresentou a maior perda de valor de Chroma a^* (28,27%) em relação às amostras que foram recobertas com IPC. O tratamento T3 apresentou a menor diminuição de Chroma a^* (15,08%). Os resultados demonstram que houve aumento na intensidade do verde até o último dia de armazenamento.

Os valores de Chroma b^* diminuíram até o último dia de armazenamento para todos os tratamentos. Foi observado que o tratamento T1 apresentou a maior perda de Chroma b^* (32,52%) em relação às amostras que foram recobertas com IPC com e sem adição de MMT. O tratamento T3 apresentou a menor diminuição de Chroma b^* (8,81%) até o último dia. Os resultados demonstram que houve aumento na intensidade do azul até o último dia de armazenamento.

Assim como para o Chroma a^* , a queda nos valores do Chroma b^* podem indicar um escurecimento oxidativo. Concordando com Fontes et al., (2008) que observaram nas polpas de maçãs MP tratadas com alginato apresentaram as menores médias de L (coloração mais escura) dentre os tratamentos. No entanto, tais valores não diferiram estatisticamente do tratamento controle a partir do 9º dia e da dextrina ao 13º dia.

5.3.4 pH

Na Tabela 5.4 estão apresentados os resultados médios de pH, das amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de isolado protéico de corvina com e sem adição de MMT ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Tabela 5.4 Valores de pH das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	$5,93 \pm 0,1^{aC}$	$6,02 \pm 0,1^{aB}$	$6,10 \pm 0,1^{aA}$
1	$5,92 \pm 0,1^{aC}$	$6,02 \pm 0,1^{aB}$	$6,09 \pm 0,1^{aA}$
3	$5,87 \pm 0,1^{bC}$	$5,99 \pm 0,1^{bB}$	$6,09 \pm 0,2^{aA}$
5	$5,55 \pm 0,1^{cC}$	$5,88 \pm 0,2^{cA}$	$5,81 \pm 0,1^{bB}$
7	$5,11 \pm 0,2^{dC}$	$5,62 \pm 0,1^{dB}$	$5,79 \pm 0,1^{cA}$
9	$4,52 \pm 0,1^{eC}$	$5,51 \pm 0,1^{eB}$	$5,72 \pm 0,1^{dA}$
12	$4,04 \pm 0,2^{fC}$	$5,25 \pm 0,2^{fB}$	$5,40 \pm 0,2^{eA}$

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

O pH das amostras de mamão Formosa minimamente processado foi influenciada pelo tempo de armazenamento e pela aplicação da cobertura pode-se observar que o pH do mamão Formosa diminuiu com o tempo, entretanto, o tratamento T1 apresentou menor pH (4,04). O tratamento T3 obteve menor diminuição do pH (11,33%). O tratamento T1 apresentou 31,76% de perda de pH até o último dia de armazenamento.

Após 12 dias de armazenamento, ao comparar os valores de pH dos mamões recobertos com IPC com e sem MMT em relação ao controle, apresentou diferença significativa entre os 3 tratamentos. De acordo com os resultados, pode-se observar que houve redução dos valores de pH durante o armazenamento. O decréscimo

destes valores pode estar associado à produção de ácidos orgânicos, como ácido málico e cítrico, durante o armazenamento decorrente de reações bioquímicas (LIMA et al., 2005).

Isto concorda com Godoy et al., (2003) onde o pH das amostras de mamão minimamente processado armazenadas sob refrigeração por 9 dias em diferentes embalagens diminui durante o armazenamento, variando de 5,57 a 4,83. Da mesma forma, Oliveira Jr. et al., (2000) ao avaliarem o pH de amostras de mamão minimamente processado e armazenados sob diferentes temperaturas por 8 dias percebeu uma redução do pH ao longo do armazenamento, variando de 5,65 a 5,30. Isto concorda com os resultados obtidos no presente trabalho.

5.3.5 Acidez titulável

Na Tabela 5.5 estão presentes os resultados médios de acidez titulável, das amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de isolado protéico de corvina com e sem adição de MMT ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Pode-se verificar na Tabela 5.5 que os valores de acidez das amostras de mamão minimamente processado tanto o tratamento T1 como os tratamentos que utilizaram coberturas de isolado protéico de corvina com e sem adição de montmorilonita apresentaram comportamento inverso ao do pH, pois a acidez aumentou ao longo do tempo de armazenamento. Assim como nos valores de pH, a aplicação das diferentes coberturas influenciou no aumento da acidez.

Tabela 5.5 Valores de acidez titulável (g ácido cítrico/100 g) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	0,038 ± 0,01 ^{ca}	0,022 ± 0,01 ^{bb}	0,022 ± 0,01 ^{bb}
1	0,038 ± 0,01 ^{ca}	0,021 ± 0,01 ^{bb}	0,021 ± 0,01 ^{bb}
3	0,042 ± 0,02 ^{bcA}	0,021 ± 0,02 ^{bb}	0,021 ± 0,01 ^{bb}
5	0,061 ± 0,01 ^{abcA}	0,039 ± 0,01 ^{abB}	0,050 ± 0,01 ^{abB}
7	0,073 ± 0,01 ^{abA}	0,050 ± 0,01 ^{abB}	0,050 ± 0,01 ^{abB}
9	0,082 ± 0,01 ^{aa}	0,060 ± 0,01 ^{abB}	0,059 ± 0,01 ^{abB}
12	0,089 ± 0,01 ^{aa}	0,071 ± 0,02 ^{abB}	0,070 ± 0,01 ^{abB}

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p\leq 0,05$). Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

Os valores de acidez titulável aumentaram até o último dia de armazenamento para todos os tratamentos. Os tratamentos T2 e T3 não apresentaram diferença significativa até o último dia de armazenamento. O tratamento T1 apresentou diferença significativa com os tratamentos que utilizaram coberturas de filme de isolado protéico de corvina com e sem adição de MMT.

Concordando com Sarzi et al., (2002a) que também verificaram um aumento nos teores de acidez titulável de mamão cortado em pedaços, atribuindo o aumento da acidez ao incremento de ácido galacturônico, em decorrência da atividade enzimática. Godoy et al., (2003) encontraram para acidez total titulável de mamão Formosa armazenados em bandejas um aumento de 0,05% para 0,10% ao término de nove dias de armazenamento, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho.

5.3.6 Sólidos solúveis totais (°Brix)

Na Tabela 5.6 se apresentam os resultados médios de sólidos solúveis totais, das amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de

isolado protéico de corvina com e sem adição de MMT ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Tabela 5.6 Valores de sólidos solúveis totais das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	11,1 ± 0,1 ^{fB}	12,2 ± 0,1 ^{dA}	12,2 ± 0,1 ^{bA}
1	11,1 ± 0,1 ^{fB}	12,1 ± 0,1 ^{dA}	12,1 ± 0,1 ^{bA}
3	11,4 ± 0,1 ^{eB}	12,2 ± 0,1 ^{cdA}	12,1 ± 0,1 ^{bA}
5	11,6 ± 0,1 ^{dB}	12,3 ± 0,1 ^{bcA}	12,2 ± 0,1 ^{abA}
7	11,7 ± 0,1 ^{cC}	12,3 ± 0,1 ^{abcA}	12,2 ± 0,1 ^{abB}
9	12,0 ± 0,1 ^{bB}	12,4 ± 0,1 ^{abA}	12,2 ± 0,1 ^{abA}
12	12,3 ± 0,1 ^{aB}	12,5 ± 0,1 ^{aA}	12,3 ± 0,1 ^{aB}

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p\leq 0,05$). Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

Os valores de °Brix aumentaram até o último dia de armazenamento para todos os tratamentos. Os tratamentos T2 e T3 não apresentaram diferença significativa até o quinto dia de armazenamento. O tratamento T1 apresentou diferença significativa desde o primeiro dia com os tratamentos que utilizaram coberturas de isolado protéico de corvina com e sem MMT. Os valores de °Brix no mamão sem cobertura aumentaram à medida que aumentou o amadurecimento devido à maior degradação ou biossíntese de polissacarídeos e em decorrência da maior perda de umidade ocorre o acúmulo de açúcares nos tecidos. Os tratamentos T2 e T3 apresentaram mínimo aumento dos valores de °Brix, demonstrando que as coberturas de IPC foram satisfatórias como barreira ao oxigênio.

Segundo Carmo (2004), os processos metabólicos relacionados com o avanço do amadurecimento, provavelmente pela dissociação de algumas moléculas e enzimas estruturais em compostos solúveis, influem diretamente nos teores de sólidos solúveis, em que frutos em avançados estádios de amadurecimento apresentam os

teores mais elevados de sólidos solúveis, concordando com os resultados encontrados no presente trabalho.

5.3.7 Análises microbiológicas

Nas Tabelas 5.7 e 5.8 estão apresentadas as taxas de crescimento de micro-organismos psicotróficos, bolores e leveduras das amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de isolado protéico de corvina com e sem MMT ao longo de 12 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

Tabela 5.7 Taxa de crescimento de micro-organismos psicotróficos Log (UFC.g⁻¹) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	11,1 ± 0,1 ^{fB}	12,2 ± 0,1 ^{dA}	12,2 ± 0,1 ^{bA}
1	11,1 ± 0,1 ^{fB}	12,1 ± 0,1 ^{dA}	12,1 ± 0,1 ^{bA}
3	11,4 ± 0,1 ^{eB}	12,2 ± 0,1 ^{cdA}	12,1 ± 0,1 ^{bA}
5	11,6 ± 0,1 ^{dB}	12,3 ± 0,1 ^{bcA}	12,2 ± 0,1 ^{abA}
7	11,7 ± 0,1 ^{cC}	12,3 ± 0,1 ^{abcA}	12,2 ± 0,1 ^{abB}
9	12,0 ± 0,1 ^{bB}	12,4 ± 0,1 ^{abA}	12,2 ± 0,1 ^{abA}
12	12,3 ± 0,1 ^{aB}	12,5 ± 0,1 ^{aA}	12,3 ± 0,1 ^{aB}

Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

Através dos resultados, pode-se observar que as amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de filme nanocompósitos de isolado protéico de corvina com e sem MMT apresentaram comportamento similar em relação ao crescimento de micro-organismos psicotróficos. Entretanto, o crescimento destes micro-organismos no tratamento controle (T1) foi superior aos tratamentos com cobertura. O tratamento de cobertura de filme nanocompósito de IPC e MMT (T3) foi o que apresentou o menor crescimento de micro-organismos.

Andrade (2006) na avaliação do crescimento de microrganismos psicotróficos em mamão minimamente processado verificou que, independente do tratamento

aplicado (amostra controle, ácido ascórbico e cloreto de cálcio), houve aumento no número de psicrotróficos, alcançando entre $6,3 \cdot 10^3$ a $8,0 \cdot 10^3$ UFC.g⁻¹, Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo, com variação de $2,03 \cdot 10^3$ a $10,53 \cdot 10^3$ UFC.g⁻¹.

Tabela 5.8 Taxa de crescimento de micro-organismos bolores e leveduras (UFC.g⁻¹) das amostras de mamão minimamente processado, utilizando diferentes coberturas armazenadas a 4 ± 1 °C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	T1	T2	T3
0	11,1 ± 0,1 ^{fB}	12,2 ± 0,1 ^{dA}	12,2 ± 0,1 ^{bA}
1	11,1 ± 0,1 ^{fB}	12,1 ± 0,1 ^{dA}	12,1 ± 0,1 ^{bA}
3	11,4 ± 0,1 ^{eB}	12,2 ± 0,1 ^{cdA}	12,1 ± 0,1 ^{bA}
5	11,6 ± 0,1 ^{dB}	12,3 ± 0,1 ^{bcA}	12,2 ± 0,1 ^{abA}
7	11,7 ± 0,1 ^{cC}	12,3 ± 0,1 ^{abcA}	12,2 ± 0,1 ^{abB}
9	12,0 ± 0,1 ^{bB}	12,4 ± 0,1 ^{abA}	12,2 ± 0,1 ^{abA}
12	12,3 ± 0,1 ^{aB}	12,5 ± 0,1 ^{aA}	12,3 ± 0,1 ^{aB}

Onde: T1 (Controle) mamão sem revestimento, T2 (mamão recoberto com IPC puro), T3 (mamão recoberto com IPC com adição de MMT).

Através dos resultados, pode-se observar que as amostras de mamão Formosa minimamente processado utilizando coberturas de isolado protéico de corvina com e sem MMT apresentaram comportamento similar em relação ao crescimento de bolores e leveduras. Entretanto, o crescimento destes micro-organismos no tratamento T1 foi superior aos tratamentos com cobertura. O tratamento com cobertura de IPC e MMT (T3) foi o que apresentou o menor crescimento de bolores e leveduras. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre o tratamento T1 e os tratamentos com cobertura (T2 e T3) até o ultimo dia de armazenamento.

Não foi detectada a presença de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes ($<10^2$ UFC.g⁻¹), assim como de *Salmonella* (ausência em 25 g) em todos os tratamentos de mamão Formosa minimamente processado, confirmando a eficiência dos cuidados higiênicos e da ação do cloro orgânico na desinfecção das amostras. Segundo a legislação, é permitido em frutas frescas preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas e refrigeradas a presença de Coliformes

termotolerantes em até 5.10^2 UFC.g⁻¹ e ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra (BRASIL, 2001).

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com aqueles obtidos por Sarzi et al., (2002b). Os autores verificaram que as condições higiênicas adotadas durante o processamento de mamão Formosa minimamente processado foram eficientes, pois não foi detectada a presença de Coliformes totais e termotolerantes durante o armazenamento por até 14 dias.

CONCLUSÕES

- O isolado protéico de CMS de corvina apresentou resultados satisfatórios nas propriedades retenção de água e solubilidade, o que indicou que poderia ser utilizados para elaboração de produtos com maior valor agregado e no desenvolvimento de filmes e coberturas comestíveis.
- O processo de variação de pH com solubilização alcalina apresentou-se eficaz na redução do teor de lipídios dos isolados protéicos de corvina.
- O isolado protéico de CMS de corvina apresentou valor protéico de 97,87%.
- Os filmes nanocompósitos produzidos com IPC e MMT foram promissores, desde o ponto de vista das propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação, força na ruptura), a aparência visual e fácil manuseio, bem como a baixa permeabilidade ao vapor de água e a baixa solubilidade. Com relação às propriedades mecânicas, a concentração de IPC e MMT foi o principal fator que influenciou no desenvolvimento dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT. O planejamento experimental utilizado determinou que 3,5 g de IPC; 0,5 g de MMT e 30 (g/100 g de IPC) de glicerol foram os parâmetros ideais para desenvolvimento de filmes nanocompósitos de IPC e MMT utilizando a técnica de “*casting*”.
- A aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta se mostrou eficiente no estudo de caracterização dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT. É importante ressaltar que o controle da espessura na elaboração de filmes com planejamento experimental é de extrema importância, uma vez que esta característica influenciou fortemente as propriedades mecânicas, óticas e de permeabilidade ao vapor de água.
- A análise comparativa de raios-x e dos espectros de infravermelho médio dos filmes mostrou que possuem uma estrutura amorfa como consequência do tratamento térmico efetuado sobre a solução filmogênica, e que as propriedades dos filmes estão associadas a bandas de absorbância entre 1600 e 570 cm^{-1} .

- A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura dos filmes mostrou que os filmes de IPC e MMT apresentaram uma superfície homogênea, lisa e contínua, sem estrutura granulada e porosa.
- As diferentes coberturas, aplicadas com e sem montmorilonita em mamão minimamente processado, à base de filme de isolado protéico de corvina foram eficientes na redução da perda de massa, manutenção de firmeza e cor, controle dos microrganismos psicotróficos, bolores e leveduras durante os 12 dias de armazenamento.
- O revestimento com cobertura nanocompósita de isolado protéico de corvina e montmorilonita aplicado em mamão minimamente processado apresentou menor perda de massa 5,26%, menor crescimento microbiano e menor diminuição de firmeza, luminosidade e pH conseqüentemente apresentou os melhores resultados na cobertura de mamão minimamente processado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver filmes nanocompósitos de isolados protéicos utilizando outras espécies de pescado de baixo valor comercial;
- Desenvolver e caracterizar filmes de isolado protéico de corvina (IPC) e argilas organofílicas relacionando os parâmetros independentes de pH, concentração de plastificante (Cg), concentrações mais altas de argilas e condições de secagem, definidas pela temperatura e tempo de secagem (T °C/h);
- Desenvolver filmes em pH baixos utilizando reagentes comestíveis para obter um filme 100% biodegradável e comestível;
- Realizar análises calorimétricas de varredura nos filmes nanocompósitos de isolado protéico de corvina e montmorilonita;
- Analisar propriedades de barreira a permeabilidade aos gases (oxigênio, gás carbônico) nos filmes de isolado protéico de corvina e montmorilonita;
- Estudar diferentes aplicações para os filmes nanocompósitos obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUGOCH, L. E.; TAPIA, C.; VILLAMÁN, M. C.; YAZDANI-PEDRAM, M.; DÍAZ-DOSQUE, M. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**, 25, 879-886, 2011.

AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starchegelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, 26, 108-117, 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC, 676 p., 2001.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL (ASTM). **Standard Test Methods for Tensile properties of Thin Plastic Sheeting**. ASTM D882-91, p.9, Philadelphia, USA, 1995.

ANDRADE, S. R. R. Processamento mínimo de mamão (Carica papaya L): efeitos de aditivos químicos e atmosfera modificada na qualidade do produto. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 178 p., 2006.

ARAUJO-FARRO, P. C. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow) da variedade "Real". **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos) UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 320p., 2008.

ARAUJO-FARRO, P. C.; PODADERA, G.; SOBRAL, J. P. A.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow) starch. **Carbohydrate Polymers**, 81, 839-848, 2010.

ASSIS, O. B. G.; FORATO, L. A.; BRITTO, D. Revestimentos comestíveis protetores em frutos minimamente processados. **Higiene Alimentar**, 22, 99-106, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

ASTM. **D1746. Standard test method for transparency of plastic sheeting**. Designation. PA: American Society for Testing and Materials, p.352, 2003.

ASTM. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting.** Designation D882. In Annual book of American standard testing methods (pp. 162-170). Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 2001.

ASTM. **Standard test methods for water vapor transmission of materials.** Designation E96-95. In Annual book of American standard testing methods (pp. 406-413). Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 1995.

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. **Journal of Food Science**, 58, 904-907, 1993.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. **Carbohydrate Polymers**, 56, 111-122, 2004.

BADOLATO, E. S. G; CARVALHO, J. B.; AMARAL MELLO, M. R. P.; TAVARES, M.; CAMPOS, N. C.; AUED- PIMENTEL, S.; MORAIS, C. Composição centesimal de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 54, 27-35, 1994.

BAE, H. J.; PARK, H. J.; HONG, S. I.; BYUN, Y. J.; DARBY, D. O.; KIMMEL, R. M.; WHITESIDE, W. S. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, 42, 1179-1186, 2009.

BALDWIN, E. A.; BURNS, J. K.; KAZOKAS, W.; BRECHT, J. K.; HAGENMAIER, R. D.; BENDER, R. J.; PESIS, E. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, n. 3, p. 215-226, 1999.

BALDWIN, E. A.; NISPEROS, M. O.; CHEN, X.; HAGENMAIER, R. D. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. **Postharvest Biology and Technology**, 9, 151-163, 1996.

BANDMAN, E. Chemistry of animal Tissues, Part 1-Proteins. En The Science of meat and meat products. Editores: Price F.J. y Schweigert S.B. 3a ed. **Food and Nutrition Press**, Inc. Connecticut, USA, 1987.

BATISTA, I.; MENDES, R.; NELHAS, R.; PIRES, C. Proteins from sardine and blue whiting recovered by new extraction techniques: Solubility and gelation properties., Icelandic Fisheries Laboratories. **First Joint Trans Atlantic Fisheries Technology Conference**, 2003.

BATISTA, I.; PIRES, C.; NELHAS, R. Extraction of sardine proteins by acidic and alkaline solubilisation. **Food Science Technology International**, 13, 189-194, 2007.

BATISTA, I.; PIRES, C.; NELHAS, R.; GODINHO, V. **Acid and alkaline-aided protein recovery from Cape Hake by-products**. Seafood research from fish to dish. Wageningen: Wageningen Academic Serial (Book, Monograph), 2006.

BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25, 781-788, 2005.

BECHTEL, P. J.; SATHIVEL, S.; OLIVEIRA, A. C. M. Alkali extracted protein fractions from salmon byproducts. **Annual IFT Meeting**, New Orleans, Louisiana, 2005.

BHARADWAJ, R. K. Modeling the barrier properties of polymer-layers silicate nanocomposites. **Macromolecules**, 21, 9182-9189, 2001.

BIZARRIA, M. T. M. Nanocompósitos de poli(tereftalato de etileno) grau garrafa reciclado e montmorilonita organofílica. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas - SP. 98 p., 2007.

BONACINA, M.; QUEIROZ, M. I. Elaboração de empanado a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27, 544-552, 2007.

BONILLA, J.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRAT, A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, 26, 9-16, 2012.

BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. **Progress in Polymer Science**, 34, 125–155, 2009.

BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, 15, 237-248, 2008.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch chitosan blend biodegradable film. **LWT – Food Science and Technology**, 41, 1633–1641, 2009.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S.; JANTAWAT, P.; SANGUANDEEKUL, R. Effect of plasticizer type and concentration on the properties of edible film from watersoluble fish proteins in surimi wash-water. **Food Science and Technology International**, 12, 119-126, 2006.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometer**, 2, 455-475, 1960.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Portaria nº 73** de 24 de novembro de 2003. Secretária Municipal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, Tamanhos mínimos para captura de peixes marinhos, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 46-53, 2001.

BRENNER, T.; NICOLI, T.; JOHANNSSON, R.; Rheology of thermo-reversible fish protein isolate gels. **Food Research International**, 42, 915–924, 2009.

BUTZIOFF, P.; D’SOUZA, N. A. Epoxy + Montmorillonite Nanocomposite: Dynamic Mechanical Analysis. **Annual Technical Conference of the Society of Plastics Engineers**, p. 1527, 2000.

CALLISTER, W. D. **Características, aplicações e o processamento de polímeros**. In: **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. Rio de Janeiro: LTC livros técnicos e científicos, p. 327-357, 2002.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, 21, 1153 – 1162, 2007.

CARASTAN, D. J. Obtenção e caracterização reológica de nanocompósitos de polímeros estirênicos. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP, 2007.

CARMO, S. A. Conservação pós-colheita de pimentão amarelo 'ZarcoHS'. 127f. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, 2004.

CASTELLO, J. P. Distribucion, crecimiento y maturacion sexual de la corvina juvenil (*Micropogonias furnieri*) en el estuario de la "Lagoa dos Patos", Brasil. **Physis**. 44, 21-26, 1986.

CAUVIN, L.; BHATNAGAR, N.; BRIEU, M. Experimental study and micromechanical modeling of MMT platelet-reinforced PP nanocomposites. **Comptes rendus mecanique**, 335, 702-707, 2007.

CENTENARO, G. S. Efeito do grau de hidrólise nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). 98f. **Dissertação** (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2007.

CENTENARO, G. S.; SALAS-MELLADO, M. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo protéico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 26, 61-70, 2008.

CHAMBI, H.; GROSSO C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, 39, 458-466, 2006.

CHANG, Y. P.; KARIM, A. A.; SEOW, C. C. Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. **Food Hydrocolloids**, 20, 1-8, 2006.

CHEN, C. H.; LAI, L. S. Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch decolorized hsian-tsau leaf gum films in the presence of plasticizer. **Food Hydrocolloids**, 22, 1584-1595, 2008.

CHEN, C.; KUO, W.; LAI, L. Rheological and physical characterization of filmforming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum. **Food Hydrocolloids**, 23, 2132-2140, 2009.

CHEN, Y. C.; JACZYNSKI, J. Gelation of protein recovered from Antarctic krill (*Euphausia superba*) by isoelectric solubilization/precipitation as affected by function additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 1814–1822, 2007.

CHIOU, B. S.; YEE, E.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Rheology of starch-clay nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 59, 467-475, 2005.

CHIO, B. S.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; BECHTEL, P. J.; IMAM, S. H.; GLENN, G. M.; ORTS, W. J. Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. **Journal of Food Engineering**, 95, 327–331, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2nd, Lavras: UFLA, 785p., 2005.

CHIUMARELLI, M.; FERRARI, C. C.; SARANTÓPULOS, C. I. G. L.; HUBINGER, M. D. Fresh cut 'Tommy Atkins' mango pre-treated with citric acid and coated with cassava (*Manihot esculenta Crantz*) starch or sodium alginate. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 12, 381–387, 2011.

CHIVRAC, F.; POLLET, E.; DOLE, P.; AVÉROUS, L. Starch-based nanobiocomposites: Plasticizer impact on the montmorillonite exfoliation process. **Carbohydrate Polymers**, 79, 941–947, 2010.

CHO, S.Y.; RHEE, C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*. **Food Science and Technology**, 37, 833-839, 2004.

CHOI, Y. J.; PARK, J. W. Acid-aided protein recovery from enzyme-rich Pacific whiting. **Journal of Food Science**, 67, 2962–2967, 2002.

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

COSTA, M. R.; ARAÚJO, F. Use of a tropical bay in southeastern Brazil by juvenile and subadult *Micropogonias furnieri* (Perciformes, Sciaenidae). **Journal of Marine Science**, 60, 268-277, 2003.

CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish miofibrillar proteins: formulations and functional properties. **Journal of Food Science**, 60, 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 622 e 626, 1997.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production, **Cereal Chemistry**, 75, 1-9, 1998.

DEAN, K.; YU, L. In: Smith R (ed) Biodegradable polymers for industrial application. **CRC Press**, Boca Raton, p. 289–309, 2005.

DEAN. K.; YU, L.; WU, D. Y. Preparation and characterization of melt-extruded thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Composites Science and Technology**, 76, 413-421, 2007.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. EDIPUCRS, Porto Alegre, 60p., 2007.

DENAVI, G.; PÉREZ-MATEOS, M.; AÑÓN, M.; MONTERO, P.; MAURI, A.; GÓMEZ-GUILLÉN, C. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. **Food Hydrocolloids**, 23, 2094-2101, 2009.

ELIZONDO, N. J.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly(vinyl alcohol). **Carbohydrate Polymers**, 75, 592–598, 2009.

ELSDON, T. S.; GILLANDERS B. M. Interactive effects of temperatura and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. **Fish Aquatic Science**, 59, 1796-1808, 2002.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27, 391-393, 2007.

FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. Efeito de coberturas comestíveis na vida útil de goiabas *in natura* (*Psidium guajava* L.) mantida sob refrigeração, **Brazilian Journal of Food Technology**, 6, 203-211, 2003.

FARIAS, M. C. A. Avaliação das condições higiênico – sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Animal). Universidade Federal do Pará, Belém, 67f., 2006.

FELDMAN, D. Polymer Barrier Films. **Journal of Polymers and the Environment**, 9, 49-55, 2001.

FERNANDEZ, G.; VENKATRAMMANN, J. Role of omega-3 fatty acids in health and disease. **Nutrition Research**, 1, 19–45, 1993.

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

FOLLAIN, N.; JOLY, C.; DOLE, P.; BLIARD, C. Mechanical properties of starch-based materials. I. Short review and complementary experimental analysis. **Journal of Applied Polymer Science**, 97, 1783-1794, 2005.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; Obtenção e avaliação de concentrados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, 32, 2299-2303, 2009.

FONTES, L. C. B.; SARMENTO, S. B. S.; SPOTO, M. H. F.; DIAS, C. T. S. Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28, 872-880, 2008.

FREITAS, I. R. Otimização do processo de obtenção de isolados protéicos provenientes de pescado de baixo valor comercial. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande. 2011.

GACULA, M. C.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. London: **Academic Press, INC.**, 1984.

GARCIA, E. E. C. Nanocompósitos: novas opções em materiais de embalagem. Campinas, **CETEA/ITAL**, 2003.

GARCIA, M.; MARTINO, M.; ZARITZKY, N. Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52, 118-124, 2000.

GARCIA, E. E. C.; PADULA, M.; SARANTÓPULOS, C. I. G. L. Embalagens Plásticas: propriedades de barreira. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, p. 44, 1989.

GARCIA-SIFUENTES, C.; PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SÁNCHEZ, M.; GARCIA-SÁNCHEZ, G.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C.; GARCIA-CARREÑO, F. Properties of recovered solids from stick-water treated by centrifugation and pH shift. **Food Chemistry**, 114, 197–203, 2009.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coating and films based on proteins. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O. (Eds.), **Edible Coatings and to Improve Food Quality**, Technomic Publishing Company, NY. USA., Chapter 9, p.201-277, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. **Cereal Foods World**, 36, 1004–1009, 1991.

GIANNELIS, E. P. Polymer layered silicate nanocomposites. **Advanced Materials**, 8, 29-35, 1996.

GODOY, R. C. B.; MATOS, E. L. S.; SANTOS, A. P.; LEDO, C. A. S.; AMORIN, T. S.; PEREIRA, M. E. C. Avaliação das alterações físico-químicas e químicas de mamão minimamente processado, variedade solo, armazenado em embalagens Pet e em bandejas com PVC. **Papaya Brasil**, Vitória, p. 677-680, 2003.

GOMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P.; FERNANDEZ-MARTIN, F.; GOMEZ-GUILLEN, M. C. Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. **Journal of Food Engineering**, 90, 480–486, 2009.

GOMEZ-GUILLEN, M. C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae Turcz*). **Food Hydrocolloids**, 21, 1133–1143, 2007.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science & Technology**, 20, 3-16, 2009.

GONTARD, N. Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. 174 f. **Tese** (Doutorado em Biochimie, Biologie Cellulaire et Moleculaire) – Université Montpellier II, Montpellier, 1991.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensm - Wiss Technology**, 29, 10-17, 1995.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim do SBCTA**, 30, 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**, 57, 190-195, 1992.

GUILBERT, S.; BIQUET, B. **Películas y envolturas comestibles de los alimentos de gran consume**. Ed. Acríbia S. A., 22, 331-371, 1995.

HAMBLETON, A.; DEBEAUFORT, F.; BONNOTTE, A.; VOILLEY, A. Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. **Food Hydrocolloids**, 23, 2116-2124, 2009.

HAN, J. H.; KROCHTA, J. M. Physical properties of whey protein coating solutions and films containing antioxidants. **Journal of Food Science**, 72, 308-314, 2007.

HENDRIX, K. M.; MORRA, M. J.; LEE, H. B.; MIN, S. C. Defatted mustard seed meal-based biopolymer film development. **Food Hydrocolloids**, 26, 118-125, 2012.

HOOD, L. L. Collagen in sausage casings. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A. J. Bailey (Eds.), **Advance in meat research**. NewYork: Van Nostrand Reinhold Co, 1987.

HOQUE, S. M.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, 25, 82-90, 2011.

HUANG, M.; YU, J. Structure and properties of thermoplastic corn starch/montmorillonite biodegradable composites. **Journal of Applied Polymer Science**, 99, 170–176, 2006.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Lagunares e Estuarinos, Projeto Estatística Pesqueira. Desembarque de pescado no Rio Grande do Sul: 2008. Rio Grande IBAMA/CEPERG, 2009.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; TANAKA, M. Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of big eye snapper and brown stripe red snapper. **European Food Research Technology**, 22, 229-235, 2006.

KAMPEERAPAPPUN, P.; AHT-ONG, D.; PENTRAKON, D.; SRIKULKIT, K. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. **Carbohydrate Polymers**, 67, 155 e 163, 2007.

KESTER, J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, 40, 47-59, 1986.

KING, A. D.; BOLIN, H. R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, 43, 132-139, 1989.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A.; VOILLEY A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 11, 503–510, 2010.

KOŁODZIEJSKA, I.; PIOTROWSKA, B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatine-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. **Food Chemistry**, 103, 295-300, 2007.

KOŁODZIEJSKA, I.; PIOTROWSKA, B.; BULGE, M.; TYLINGO, R. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatine-chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, 65, 404-409, 2006.

KRISTINSSON, H. G. Conformational and functional changes of hemoglobin and myosin induced by pH: functional role in fish quality. **Ph.D. thesis**. University of Massachusetts, Amherst, MA, USA, 2001.

KRISTINSSON, H. G. **Developments with functional fish proteins**. Research Aquatic Food Products Program. Laboratory of Aquatic Food Biomolecular. Department of Food Science and Human, 2003.

KRISTINSSON, H. G.; INGADOTTIR, B. Recovery and properties of muscle proteins extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) light muscle by pH shift processing. **Journal of Food Science**, 71, 132-141, 2006.

KRISTINSSON, H. G.; THEODORE, A. E.; DEMIR, N.; INGADOTTIR, B. A comparative study between acid- and alkali-aided processing and surimi processing for the recovery of proteins from channel catfish muscle. **Food Chemistry and Toxicology**, 70, C298 - C 306, 2005.

KRISTINSSON, H.; HULTIN, H. O. Changes in trout hemoglobin conformations and solubility after exposure to acid and alkali pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 5103–5110, 2004.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; ZAMPRAKA, A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Bio polymer compositions effects and impact of beeswax lamination. **Food Chemistry**, 101, 753-764, 2007.

KROCHTA, J. M. Control of mass transfer in foods with edible-coatings and films. In R. P. Singh e M. A. Wirakartakusumah (Eds.), *Advances in food engineering*. London: **CRC Press**, p. 517 e 538, 1992.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, 51, 61-74, 1997.

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

KVIEN, I.; SUGIYAMA, J.; VOTRUBEC, M.; OKSMAN, K. Characterization of starch based nanocomposites. **Journal of Material Science**, 42, 8163-8171, 2007.

LAGALY, G. Introduction: from clay mineral-polymer interactions to clay mineral-polymer nanocomposites. *Journal of Material Science*, 42, 8163-8171, 1999.

LI, P.; BARTH, M. M. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, 14, 51-60, 1998.

LIMA, A. S.; RAMOS, A. L. D.; MARCELLINI, P. S.; BATISTA, R. A.; FARAONI, A. S. Adição de Agentes Antiescurecimento, Antimicrobiano e Utilização de diferentes Filmes Plásticos em Mamão Minimamente Processado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 27, 149-152, 2005.

LIU, L.; LIU, C. K.; FISHMAN, M. L.; HICKS, K. B. Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 2349-2355, 2007.

LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. **Food Hydrocolloids**, 26, 311-317, 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, 1951.

MALI, S. Produção, caracterização e aplicação de filmes plásticos biodegradáveis a base de amido de cará. **Tese** (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos. Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 362 f., 2002.

- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCIA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. **Journal of Food Engineering**, 75, 453–460, 2006.
- MALI, S.; SAKANAKA, L. S.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, 60, 283-289, 2005.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, Cap.10, p.58, 1999.
- MARCUZZO, E.; PERESSINI, D.; DEBEAUFORT, F.; SENSIDONI, A. Effect of ultrasound treatment on properties of gluten-based film. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 11, 451–457, 2010.
- MARTINS, V. G. Obtenção de um hidrogel proveniente de proteínas da corvina (*Micropogonias furnieri*) e solubilização das proteínas fibrosas residuais. **Tese** (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2009.
- MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, 32, 61-66, 2009.
- MCGLASHAN, S. A.; HALLEY, P. J. Preparation and characterization of biodegradable starch-based nanocomposite materials. **Polymer International**, 52, 1767–1773, 2003.
- MEI, Y.; ZHAO, Y. Barrier and mechanical properties of milk protein edible films containing nutraceuticals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1914-1918, 2003.
- MENEZES N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil**. IV. Teleostei Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 96 pp. 1980.
- MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. **Trends in Food Science and Technology**, 8, 228-237, 1997.

MOHAN, C. O.; RAVISHANKAR, C. N.; LATITHA, K. V.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, 26, 167-174, 2012.

MONTANO-LEYVA, B.; TORRES-CHAVEZ, P.; RAMIREZ-WONG, B.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; BROWN-BOJORQUEZ, F. Physical and mechanical properties of durum wheat (*Triticum durum*) starch films prepared with A- and B-type granules. **Starch-Starke**, 60, 559-567, 2008.

MONTERREY-QUINTERO E. S.; SOBRAL A. P. J. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de Tilapia – do- Nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 35, 179-189, 2000.

MONTERREY-QUINTERO, E. S. Caracterização físico-química de Proteínas Miofibrilares e Elaboração de Biofilmes. **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, 83p., 1998.

MORR, V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILLARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**. 50, 1715, 1985.

MÜLLER, C. M. O. Estudo dos processos de transferência de massa e propriedades mecânicas de biofilmes de amido de mandioca reforçadas com fibras de celulose. **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

MURATORE, G.; DEL NOBILE, M. A.; BUONOCORE, G. G.; LANZA, C. M.; ASMUNDO, N. The influence of using biodegradable packaging films on the quality decay kinetic of plum tomato (*Pomodoro Datterino*). **Journal of Food Engineering**, 67, 393-399, 2005.

MURILLO-MARTÍNEZ, M. M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATO-CALLEROS, C.; MARTÍNEZ-FEREZ, A.; VERNON-CARTES, E. J. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by proteinopolysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, 25, 577-585, 2011.

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

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. **Food Bioprocess Technology**, 2, 621–627, 2009.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca - ciência e tecnologia de pescado**. São Paulo: Varela, v.1, 1999.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G.; CORDEIRO, C. A. M.; CARLOS, L. A.; COELHO, E. M.; ARAÚJO, T. M. R. Avaliação da qualidade de mamão (*Carica papaya*) minimamente processado armazenado em diferentes temperaturas. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 2, 2000, Viçosa. **Anais...Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, p.16, 2000.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**, Porto Alegre: Artmed, 1v, 2005.

PACHECO, M. T. B; SGARBIERI, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas aplicações nas propriedades funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 36, 83-94, 2002.

PAIVA, L. B. de; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Organoclays: Properties, preparation and applications. Review Article. *Applied Clay Science*, 42, 8-24, 2008.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; GUIMARÃES, T. R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 16, 136-140, 2006.

PANDEY, J. K.; KUMAR, A. P.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K.; DRZAL, L. T.; SINGH, R. P. Recent advances in biodegradable nanocomposites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 5, 497–526, 2005.

PARK, H. J. Development of advanced edible coatings for fruits. **Trends Food Science Technology**, 10, 254-260, 1999.

PARK, H. W.; LEE, W. K.; PARK, C. Y.; CHO, W. J.; HA, C. S. Environmentally friendly polymer hybrids Part I Mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Journal of Materials Science**, 38, 909–915, 2003.

PARK, J. W. Fish Protein Isolate and Its Superior Functionality. 62nd. Annual Reciprocal Meat Conference. **American Meat Science Association**. p 1-8, 2009.

PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymer**, 55,17-22, 2004.

PARRIS, N.; COFFIN, D. R.; JOUBRAN, R. F.; PESSEN, H. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43, 1432-1435, 1995.

PEGORETTI, A.; KOLARIK, J.; PERONI, C.; MIGLIARESI, C. Recycled poly(ethylene terephthalate)/layered silicate nanocomposites: morphology and tensile mechanical properties, **Polymer**, 45, 2751-2759, 2004.

PEIXOTO, A. M.; SILVA, S. M.; MARTINS, L. P.; TORRES, L. B. V.; GUIMARÃES, G. H. C. Qualidade de mamão Goldem minimamente processado e tratado com soluções conservantes. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 54TH ANNUAL MEETING OF THE INTERAMERICAN SOCIETY FOR TROPICAL HORTICULTURE, 2008, Vitória, **Anais...Vitória, Espírito Santo**, 2008.

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

PEREIRA, M. E. C.; SILVA, A. S.; BISPO, A. S. R.; SANTOS, D. B.; SANTOS, S. B.; SANTOS, V. J. Amadurecimento de mamão Formosa com revestimento comestível à base de fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras 30, 1116-1119, 2006.

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

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 2689-2692, 2000.

PÉREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. Formation and properties of whey protein films and coatings. In: Gennadios, A. (Ed.), Protein-based films and coatings (pp. 159-177). Boca Raton London New York Washington, D.C: **CRC Press LLC**, 2002.

PÉREZ-GAGO, M. B.; SERRA, M.; ALONSO, M.; MATEOS, M.; DEL-RÍO, M. A. Effect of solid content and lipid content of whey protein isolate-beeswax edible coatings on color change of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, 68, 2186-2191, 2003.

PORTO, C. J. S.; CLEMENTE, S. C. S.; FREITAS, M. Q.; CLEMENTE, R. R. B. S.; KNOFF, M.; MATOS, E. Pterobothrium crassicolle (Eucestoda: *Trypanorhyncha*) em corvinas, *Micropogonias furnieri*, comercializadas no município de Niterói, Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, 16, 133-135, 2009.

PRANOTO, Y.; LEE, C. M.; PARK, H. J. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and k-carrageenan. **LWT e Food Science and Technology**, 40, 766-774, 2007.

QI, H.; HU, W.; JIANG, A.; TIAN, M.; LI, Y. Extending shelf-life of Fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 12, 62-66, 2011.

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

RAWDKUEN, S.; SAI-UT, S.; KHAMSORN, S.; CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. **Food Chemistry**, 112, 112-119, 2009.

RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, 28, 1539-1641, 2003.

RAY, S. S.; YAMADA, K.; OKAMOTO, M.; UEDA, K. New polylactide/layered silicate nanocomposites. 2. Concurrent improvements of material properties, biodegradability and melt rheology. **Polymer**, 44, 857-866, 2003.

REGENSTEIN, J. M.; JAUREGUI, C. A.; BAKER, R. The effect of pH, polyphosphates and different salts on water retention properties of ground trout muscle. **Journal of Food Biochemistry**. 8, 123-131, 1984.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology/ **LWT - Food Science and Technology**. 41, 1624 -1632, 2008.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, Kidlington, 37, 323-330, 2004.

RHIM, J. W.; HONG, S. I.; PARK, H. M.; NG, P. K. W. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 5814–5822, 2006.

RHIM, J. W.; LEE, J. H.; KWAK, H. S. Mechanical and barrier properties of soy protein and clay mineral composite films. **Food Science and Biotechnology**, 14, 112–116, 2005.

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

RHIM, J. W.; WELLER, C. L. Properties of formaldehyde adsorbed soy protein isolate films. **Food Science Biotechnology**, 9, 228–233, 2000.

ROGER, C. E. Permeation of gases and vapours in polymers. In J. Comyn (Ed.), Polymer permeability (pp. 11e75). New York: **Elsevier Applied Science**, 1985.

ROKAEUS, S.; UNDELAND, I. Production of protein isolates from whole and gutted herring (*Clupea harengus*) using a pH shift method. Lisboa, Portugal, **WEFTA**, 2007.

ROY, S.; GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. **Industrial Crops and Products**, 22, 43-50, 2000.

RUBAN, S. W. Biobased packaging e application in meat industry. **Veterinary World**, 2, 79-82, 2009.

RYAN, M. H.; MCINERNEY, J. K.; RECORD, I. R.; ANGUS, J. F. Zinc bioavailability in wheat grain in relation to phosphorus fertilizer, crop sequence and mycorrhizal fung. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88, 208-1216, 2008.

SAKANAKA, L. S. Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA). **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos) Centro de Ciências, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 108p. 2007.

SAKANAKA, L. S. Estudo das condições de armazenamento sobre as propriedades mecânicas e de barreira de filmes de gelatina reticulada. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 256 p., 2002.

SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 10205-10214, 2006.

SANTANA, A.; OKAMOTTO, P. T.; BARBOZA, L. C.; FIGUEIREDO, L. C.; GRACIOSO, F.; ROSSITER, R.; PAULA, J.; MAYANA, P.; GALLUCCI, L.; MAURICIO, M.; GIDRA, G.; CUNHA, R. D. **Hortaliças minimamente processadas**. Estudos de mercado SEBRAE/ESPM 2008. Relatório completo. Série Mercado. p.1-174, 2008.

SANTOS, R. A. L. Aplicação de nanoargilas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis. **Dissertação** (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos. Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 94 f., 2010.

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. 3 ed. **CETEA – ITAL**, Brasil, 267 p., 2002.

SARMENTO, A. L. S. C. Elaboração e caracterização de biofilmes a partir de gelatina reticulada. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, São Paulo, 1999.

SARZI, B.; DURIGAN, J. F.; DONADON, J. R.; TEIXEIRA, G. H. A.; LIMA, M. A. Qualidade de produto minimamente processado de mamão 'Formosa' utilizando-se dois tipos de preparo e armazenamento sob diferentes temperaturas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, p. 2015-2018, 2002a.

SARZI, B.; DURIGAN, J. F.; DONADON, J. R.; TEIXEIRA, G. H. A.; LIMA, M. A. Armazenamento de produto minimamente processado de mamão 'Formosa' em diferentes embalagens e a 3°C, 6°C e 9°C.. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém, **Anais...** 2002b.

SATHIVEL, S. **Functional and nutritional enhancing protein isolates from Arrowtooth Flounder**. Annual Meeting- Chicago. University of Alasca, 2003.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. J. A comparison of physical and rheologic properties of arrowtooth flounder protein made using three different extracting processes. **Journal of Food Biochemistry**. 32, 557–575, 2008.

SHELLHAMMER, T. H.; KROCHTA, J. M. Whey protein emulsion film performance: effect of lipid type and amount. **Journal of Food Science**, 62, 390-394, 1997.

SIKORSKI, Z. E.; SUN, P. Preservation of seafood quality. In Shahidi, F.; Botta, J. R. (Eds.), *Seafoods: Chemistry, processing, technology and quality* (pp. 168-195). Glasgow: **Blackie Academic & Professional**, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S.A., 299p, 1987.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of Cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, 40, 1415-1424, 2005.

SOAZO, M.; RUBIOLO, A. C.; VERDINI, R. A. Effect of drying temperature and beeswax content on physical properties of whey protein emulsion films. **Food Hydrocolloids**, 25, 1251-1255, 2011.

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

SOBRAL, P. J. A. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia**, 8, 60–67, 1999.

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, 5, 377–382, 2001.

SOBRAL, P. J. A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao Vapor de Água de Biofilmes à Base de Proteínas Miofibrilares de Carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, 3, 11-16, 2000.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; TORTORA, M.; VITTORIA, V. Barrier properties of polymer/clay nanocomposites. In Mai, Y. W. e Yu, Z. Z. (Eds.), **Polymer nanocomposites** (pp. 273–292). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2006.

SOTHORNVIT, R.; HONG, S. I.; AN, D. J.; RHIM, J. W. Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **LWT – Food Science and Technology**, 43, 279-284, 2010.

SOTHORNVIT, R.; RHIM, J. W.; HONG, S. I. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. **Journal of Food Engineering**, 91, 468-473, 2009.

SOUZA, B. S.; DURIGAN, J. F. Processamento mínimo de mamão. In: MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**, Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 263-272, 2007.

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

SOUZA, V. C. Produção de filmes biopoliméricos a partir de quitosana com incorporação de fração lipídica. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) da Universidade Federal do Rio Grande. 66p., 2011.

SOUZA, V. C.; MONTE, M. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. **International Journal of Food Science and Technology**, 46, 1856-1862, 2011.

SU, J. F.; HUANG, Z.; YUAN, X. Y.; WANG, X. Y.; LI, M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, 79, 145-153, 2010.

SWAIN, S. N.; BISWAL, S. M.; NANDA, P. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable soy-based plastics: opportunities and challenges. **Journal Polymers Environment**, 12, 35-42, 2004.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** – NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação- UNICAMP. Versão 2 –2. ed., Campinas, SP, 113p, 2006.

TAKEITI, C. Y. Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos. **Dissertação** (Mestrando em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 102 p. 2002.

TANADA-PALMU; P. S.; GROSSO, C. R. F. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. **Postharvest Biology and Technology**, 36, 199-208, 2005.

TAPIA-BLÁCIDO, D.; SOBRAL, P. J.; MENEGALLI, F. C. Effect of drying temperature and relative humidity on the mechanical properties of amaranth flour films plasticized with glycerol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 22, 249-256, 2005.

TAPIA, M. S.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; CARMONA, A.; RODRÍGUEZ, F. J.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. **Food Hydrocolloids**, 22, 1493-1503, 2008.

TASKAYA, L.; CHEN, Y.C.; JACZYNSKI, J. Functional properties of proteins recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. **LWT- Food Science and Technology**, 42, 1082-1089, 2009.

TEIXEIRA, G. H. A.; DURIGAN, J. F.; MATTUIZ, B. H.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Processamento mínimo de mamão formosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21, 47-50, 2001.

THAKHIEW, W.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. **Journal of Food Engineering**, 99, 216-224, 2010.

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

UNDELAND, I.; KELLEHER, S. D.; HULTIN, H. O. Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubilization process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 7371, 2002.

USTUNOL, Z. Edible films and coatings for meat and poultry. In M. E. Embuscado, & K. C. Huber (Eds.), **Edible films and coatings for food applications**. (pp. 245-268). New York: Springer Sciences, 2009.

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

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymer: Overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, 21, 433-442, 2002.

VAN SOEST, J. J. G.; HULLEMAN, S. H. D.; WIT, D.; VLIEGENTHASRT, J. F. G. Crystallinity in starch bioplastics. **Industry Crop Production**, 5, 11–22, 1996.

VARGAS, M.; PERDONES, A.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosanbased film-forming dispersions and films. **Food Hydrocolloids**, 25, 1158-1164, 2011.

VAZZOLER, A. E. A. M. Síntese de conhecimento sobre a biologia da corvina, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), da costa do Brasil. **Atlântica**, 13, 55-74. 1991.

VEIGA-SANTOS, P.; SUZUKI, C. K.; CEREDA, M. P.; SCAMPARINI, A. R. P. Microstructure and color of starch-gum films: Effect of gum deacetylation and additives. Part 2. **Food Hydrocolloids**, 19, 1064-1073, 2005.

VICENTINI, N. M. Elaboração e caracterização de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita. **Tese** (Doutorado em Agronomia/ Horticultura). Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 198p., 2003.

WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. 1 ed., New York: Chapman & Hall, 368p., 1994.

WILHELM, H. M.; SIERAKOWSKI, M. R.; SOUZA, G. P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, 52, 101-110, 2003.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, 23, 1886-1894, 2009.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, 21, 185–192, 2005.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water conten. **Journal of Food Composition and Analysis**, 16, 81-92, 2003.

YONGSAWATDIGUL, J.; PARK, J. W. Effects of Alkali and Acid Solubilization on Gelation Characteristics of Rockfish Muscle Proteins. **Journal of Food Science**, 69, 499-505, 2004.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes protéicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29, 420-430, 2009.

ZHOU, J. J.; WANG, S. Y.; GUNASEKARAN, S. Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles. **Journal of Food Science**, 74, 50-56, 2009.

APÊNDICE

Tabela A.1 Delineamento experimental de Box e Behnken e resultados de espessura, dos filmes nanocompósitos de IPC e MMT.

T	IPC (g)	MMT (g)	Glicerol (%)	ESP (μm)*
1	(5)1	(0,7)1	(30)0	172,0 \pm 0,1
2	(5)1	(0,3)-1	(30)0	159,0 \pm 0,2
3	(2)-1	(0,7)1	(30)0	163,0 \pm 0,3
4	(2)-1	(0,3)-1	(30)0	155,0 \pm 0,1
5	(5)1	(0,5)0	(35)1	183,0 \pm 0,1
6	(5)1	(0,5)0	(25)-1	132,0 \pm 0,2
7	(2)-1	(0,5)0	(35)1	167,0 \pm 0,1
8	(2)-1	(0,5)0	(25)-1	117,0 \pm 0,1
9	(3,5)0	(0,7)1	(35)1	128,0 \pm 0,2
10	(3,5)0	(0,7)1	(25)-1	123,0 \pm 0,1
11	(3,5)0	(0,3)-1	(35)1	170,0 \pm 0,1
12	(3,5)0	(0,3)-1	(25)-1	119,0 \pm 0,2
13	(3,5)0	(0,5)0	(30)0	121,0 \pm 0,1
14	(3,5)0	(0,5)0	(30)0	123,0 \pm 0,2
15	(3,5)0	(0,5)0	(30)0	121,0 \pm 0,1

*Média de 8 repetições \pm desvio padrão. Onde: T: Tratamentos, IPC: Isolado protéico de corvina, MMT: Montmorilonita,

Análise de efeitos estimados, coeficiente de regressão para resistência à tração, alongação, modulo de elasticidade, força na ruptura, deformação na ruptura, espessura, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e transparência dos filmes nanocompósitos de IPC.

- Resistência à tração

Effect Estimates; Var.:Resistência à tração; R-sqr=.99447; Adj.:.98709 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.01 DV: Resistência à tração										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	7.925000	0.028868	274.5301	0.000013	7.80079	8.049207	7.925000	0.028868	7.800793	8.049207
IPP(Q)	1.237500	0.052042	23.7790	0.001764	1.01358	1.461417	0.618750	0.026021	0.506791	0.730709
MMT(Q)	1.587500	0.052042	30.5044	0.001073	1.36358	1.811417	0.793750	0.026021	0.681791	0.905709
(3)Glicerol(L)	-0.700000	0.070711	-9.8995	0.010051	-1.00424	-0.395757	-0.350000	0.035355	-0.502122	-0.197878
Glicerol(Q)	1.187500	0.052042	22.8183	0.001915	0.96358	1.411417	0.593750	0.026021	0.481791	0.705709
1L by 2L	-0.550000	0.100000	-5.5000	0.031504	-0.98027	-0.119735	-0.275000	0.050000	-0.490133	-0.059867
1L by 2Q	0.345000	0.067082	5.1430	0.035790	0.05637	0.633631	0.172500	0.03541	0.028185	0.316815
1L by 3L	0.450000	0.100000	4.5000	0.046002	0.01973	0.880265	0.225000	0.050000	0.009867	0.440133
2L by 3L	0.750000	0.100000	7.5000	0.017317	0.31973	1.180265	0.375000	0.050000	0.159867	0.590133

Regr. Coefficients; Var.:Resistência à tração; R-sqr=.99136; 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.01 DV: Resistência à tração						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	10.60000	0.057735	183.5974	0.000030	10.35159	10.84841
IPP(Q)	-1.23750	0.052042	-23.7790	0.001764	-1.46142	-1.01358
MMT(Q)	-1.58750	0.052042	-30.5044	0.001073	-1.81142	-1.36358
(3)Glicerol(L)	-0.35000	0.035355	-9.8995	0.010051	-0.50212	-0.19788
Glicerol(Q)	-1.18750	0.052042	-22.8183	0.001915	-1.41142	-0.96358
1L by 2L	-0.27500	0.050000	-5.5000	0.031504	-0.49013	-0.05987
1L by 2Q	-0.22500	0.050000	-4.5000	0.046002	-0.44013	-0.00987
1L by 3L	0.22500	0.050000	4.5000	0.046002	0.00987	0.44013
2L by 3L	0.37500	0.050000	7.5000	0.017317	0.15987	0.59013

- Alongação

Effect Estimates; Var.:Alongação; R-sqr=.96767; Adj.:.95886 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.2233333 DV: Alongação										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	40.17500	0.136423	294.4894	0.000012	39.58802	40.76198	40.17500	0.136423	39.58802	40.76198
IPP(Q)	2.57917	0.245939	10.4870	0.008971	1.52098	3.63736	1.28958	0.122970	0.76049	1.81868
MMT(Q)	2.90417	0.245939	11.8085	0.007095	1.84598	3.96236	1.45208	0.122970	0.92299	1.98118
Glicerol(Q)	2.40417	0.245939	9.7754	0.010303	1.34598	3.46236	1.20208	0.122970	0.67299	1.73118

Regr. Coefficients; Var.:Elongação; R-sqr=.96767; Adj:.95886 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.2233333 DV: Elongação						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	45.43333	0.272845	166.5170	0.000036	44.25938	46.60729
IPP(Q)	-2.57917	0.245939	-10.4870	0.008971	-3.63736	-1.52098
MMT(Q)	-2.90417	0.245939	-11.8085	0.007095	-3.96236	-1.84598
Glicerol(Q)	-2.40417	0.245939	-9.7754	0.010303	-3.46236	-1.34598

- Modulo de elasticidade

Effect Estimates; Var.:Módulo de Elasticidade; R-sqr=.97093; Adj:.9593 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.03 DV: Módulo de Elasticidade										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	13.36667	0.050000	267.3333	0.000014	13.15153	13.58180	13.36667	0.050000	13.15153	13.58180
IPP(Q)	1.85000	0.090139	20.5239	0.002366	1.46216	2.23784	0.92500	0.045069	0.73108	1.11892
MMT(Q)	2.52500	0.090139	28.0124	0.001272	2.13716	2.91284	1.26250	0.045069	1.06858	1.45642
Glicerol(Q)	1.67500	0.090139	18.5825	0.002883	1.28716	2.06284	0.83750	0.045069	0.64358	1.03142
1L by 2Q	0.82500	0.116190	7.1005	0.019263	0.32508	1.32492	0.41250	0.058095	0.16254	0.66246

Regr. Coefficients; Var.:Módulo de Elasticidade; R-sqr=.936 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.03 DV: Módulo de Elasticidade						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	17.40000	0.100000	174.0000	0.000033	16.96973	17.83027
IPP(Q)	-1.85000	0.090139	-20.5239	0.002366	-2.23784	-1.46216
MMT(Q)	-2.52500	0.090139	-28.0124	0.001272	-2.91284	-2.13716
Glicerol(Q)	-1.67500	0.090139	-18.5825	0.002883	-2.06284	-1.28716

- Força na ruptura

Effect Estimates; Var.:Força na ruptura; R-sqr=.9891; Adj:.96949 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.01 DV: Força na ruptura										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	7.633333	0.028868	264.4264	0.000014	7.50913	7.757540	7.633333	0.028868	7.509126	7.757540
(1)IPP(L)	-0.700000	0.074536	-9.3915	0.011149	-1.02070	-0.379299	-0.350000	0.037268	-0.510350	-0.189650
IPP(Q)	1.425000	0.052042	27.3819	0.001331	1.20108	1.648917	0.712500	0.026021	0.600541	0.824459
(2)MMT(L)	-0.350000	0.070711	-4.9497	0.038476	-0.65424	-0.045757	-0.175000	0.035355	-0.327122	-0.022378
MMT(Q)	1.250000	0.052042	24.0192	0.001729	1.02608	1.473917	0.625000	0.026021	0.513041	0.736959
(3)Glicerol(L)	-0.383333	0.074536	-5.1430	0.035790	-0.70403	-0.062633	-0.191667	0.037268	-0.352017	-0.031316
Glicerol(Q)	0.275000	0.052042	5.2042	0.033997	0.05100	0.490917	0.137500	0.026021	0.025541	0.249459
1L by 2L	0.450000	0.100000	4.5000	0.046002	0.01973	0.880265	0.225000	0.050000	0.009867	0.440133
1L by 2Q	1.275000	0.070711	18.0312	0.003062	0.97076	1.579243	0.637500	0.035355	0.485378	0.789522
1Q by 3L	0.325000	0.070711	4.5962	0.044221	0.02076	0.629243	0.162500	0.035355	0.010370	0.314522

Regr. Coefficients; Var.: Força na ruptura; R-sqr= 96/46; Adj: 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error= .01 DV: Força na ruptura						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	9.60000	0.057735	166.2769	0.000036	9.35159	9.84341
(1)IPP(L)	0.50000	0.050000	10.0000	0.005852	0.23487	0.71513
IPP(Q)	-1.42500	0.052042	-27.3819	0.001331	-1.64892	-1.20108
(2)MMT(L)	0.17500	0.035355	4.9497	0.038476	0.32712	0.02288
MMT(Q)	-1.25000	0.052042	-24.0192	0.001729	-1.47392	-1.02508
Glicerol(Q)	-0.27500	0.052042	-5.2842	0.033997	-0.49892	-0.05108
1L by 2L	0.22500	0.050000	4.5000	0.046002	0.00987	0.44013
1L by 2Q	-1.27500	0.070711	-18.0312	0.003062	-1.57924	-0.97076

- Deformação na ruptura

Effect Estimates; Var: Deformação na ruptura; R-sqr= 99/54; Adj: 99/84 (Stat film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error= 0.003333 DV: Deformação na ruptura										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	9.166667	0.016667	550.0000	0.000003	9.09486	9.238378	9.166667	0.016667	9.094956	9.233378
(1)IPP(L)	-0.883333	0.043033	-20.5268	0.002365	-1.06849	-0.698177	-0.441667	0.021517	-0.534245	-0.349088
IPP(Q)	1.091667	0.030046	36.3329	0.000757	0.96239	1.220945	0.545033	0.015023	0.481194	0.610473
(2)MMT(L)	-0.525000	0.040825	-12.8598	0.005993	-0.70066	-0.349346	-0.262500	0.020412	-0.350328	-0.171672
MMT(Q)	1.541667	0.030046	51.3098	0.000380	1.41239	1.670945	0.770833	0.015023	0.706194	0.835473
(3)Glicerol(L)	-0.303333	0.043033	-6.9079	0.012369	-0.56049	-0.190177	-0.191667	0.021517	-0.204245	-0.099000
Glicerol(Q)	-0.283333	0.030046	-9.4299	0.011059	-0.41261	-0.154055	-0.141667	0.015023	-0.206306	-0.077027
1L by 2L	0.600000	0.057735	10.3923	0.009133	0.35159	0.848414	0.300000	0.028868	0.175793	0.424207
1L by 2Q	0.925000	0.040825	22.6578	0.001942	0.74934	1.100656	0.462500	0.020412	0.374672	0.550328
1L by 3L	0.250000	0.057735	4.3301	0.049414	0.00159	0.498414	0.125000	0.028868	0.000793	0.249207
1Q by 3L	0.400000	0.040825	9.7980	0.010257	0.22434	0.575655	0.200000	0.020412	0.112172	0.287828
2L by 3L	0.450000	0.057735	7.7942	0.016065	0.20159	0.690414	0.225000	0.020060	0.100793	0.349207

Regr. Coefficients; Var.: Deformação na ruptura; R-sqr= .998 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error= .0033333 DV: Deformação na ruptura						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	10.73333	0.033333	322.0000	0.000010	10.58951	10.87676
(1)IPP(L)	0.17500	0.028868	6.0622	0.026148	0.05079	0.29921
IPP(Q)	-1.09167	0.030046	-36.3329	0.000757	-1.22095	-0.96239
(2)MMT(L)	-0.26250	0.020412	-12.8598	0.005993	-0.35033	-0.17467
MMT(Q)	-1.54167	0.030046	-51.3098	0.000380	-1.67095	-1.41239
Glicerol(Q)	0.28333	0.030046	9.4299	0.011059	0.15405	0.41261
1L by 2L	0.30000	0.028868	10.3923	0.009133	0.17579	0.42421
1L by 2Q	-0.92500	0.040825	-22.6578	0.001942	-1.10066	-0.74934
1L by 3L	0.12500	0.028868	4.3301	0.049414	0.00079	0.24921
1Q by 3L	-0.32500	0.028868	-11.2583	0.007797	-0.44921	-0.20079
2L by 3L	0.22500	0.028868	7.7942	0.016065	0.10079	0.34921

- Espessura

Effect Estimates; Var.:Espessura; R-sqr=.99866; Adj:.99687 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=1.333333 DV: Espessura										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	148.9359	0.320256	465.0522	0.000005	147.5579	150.3138	148.9359	0.320256	147.5579	150.3138
(1)IPP(L)	9.5000	0.860663	11.0380	0.008108	5.7969	13.2031	4.7500	0.430331	2.8984	6.6016
IPP(Q)	-27.6346	0.599145	-46.1234	0.000470	-30.2125	-25.0567	-13.8173	0.299572	-15.1063	-12.5284
MMT(Q)	-12.8846	0.599145	-21.5050	0.002155	-15.4625	-10.3067	-6.4423	0.299572	-7.7313	-5.1534
(3)Glicerol(L)	43.0000	0.860663	49.9615	0.000400	39.2969	46.7031	21.5000	0.430331	19.6484	23.3516
1L by 2Q	4.5000	0.816497	5.5114	0.031380	0.9869	8.0131	2.2500	0.408248	0.4934	4.0066
1Q by 2L	-14.5500	0.774597	-18.7840	0.002822	-17.8828	-11.2172	-7.2750	0.387298	-8.9414	-5.6086
1Q by 3L	-11.2500	0.816497	-13.7784	0.005226	-14.7631	-7.7369	-5.6250	0.408248	-7.3816	-3.8684
2L by 3L	-23.0000	1.154701	-19.9186	0.002511	-27.9683	-18.0317	-11.5000	0.577350	-13.9841	-9.0159

Regr. Coefficients; Var.:Espessura; R-sqr=.95311; Adj:.89059 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=1.333333 DV: Espessura						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	121.9231	0.554700	219.8000	0.000021	119.5364	124.3098
(1)IPP(L)	7.7500	0.577350	13.4234	0.005504	5.2659	10.2341
IPP(Q)	27.6346	0.599145	46.1234	0.000470	25.0567	30.2125
MMT(Q)	12.8846	0.599145	21.5050	0.002155	10.3067	15.4625
(3)Glicerol(L)	14.0000	0.577350	24.2487	0.001696	11.5159	16.4841
1L by 2Q	-4.5000	0.816497	-5.5114	0.031380	-8.0131	-0.9869
1Q by 2L	5.2500	0.577350	9.0933	0.011879	2.7659	7.7341
1Q by 3L	11.2500	0.816497	13.7784	0.005226	7.7369	14.7631
2L by 3L	-11.5000	0.577350	-19.9186	0.002511	-13.9841	-9.0159

- Solubilidade

Effect Estimates; Var.:Umidade; R-sqr=.99954; Adj:.9984 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0033333 DV: Umidade										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	15.52500	0.016667	931.5000	0.000001	15.45329	15.59671	15.52500	0.016667	15.45329	15.59671
(1)IPP(L)	-0.45000	0.043033	-10.4571	0.009021	-0.63516	-0.26484	-0.22500	0.021517	-0.31758	-0.13242
IPP(Q)	-0.20417	0.030046	-6.7951	0.020979	-0.33345	-0.07489	-0.10208	0.015023	-0.16672	-0.03744
(2)MMI(L)	-0.56667	0.043033	-13.1681	0.005718	-0.75182	-0.38151	-0.28333	0.021517	-0.37591	-0.19075
MMT(Q)	1.72083	0.030046	57.2728	0.000305	1.59155	1.85011	0.86042	0.015023	0.79578	0.92506
(3)Glicerol(L)	2.02500	0.040825	49.6022	0.000406	1.84934	2.20065	1.01250	0.020412	0.92467	1.10033
Glicerol(Q)	-0.55417	0.030046	-18.4438	0.002927	-0.68345	-0.42489	-0.27708	0.015023	-0.34172	-0.21244
1L by 2Q	-1.27500	0.040825	-31.2310	0.001024	-1.45066	-1.09934	-0.63750	0.020412	-0.72533	-0.54967
1Q by 2L	-0.85000	0.040825	-20.8207	0.002259	-1.02566	-0.67434	-0.42500	0.020412	-0.51283	-0.33717
1L by 3L	2.45000	0.057735	42.4352	0.000555	2.20159	2.69841	1.22500	0.028868	1.10079	1.34921
2L by 3L	-2.10000	0.057735	-36.3731	0.000755	-2.34841	-1.85159	-1.05000	0.028868	-1.17421	-0.92579

Regr. Coefficients; Var.: Umidade; R-sqr=.99954; Adj.:.9934 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0033333 DV: Umidade						
Factor	Regressn Coeff.	Std. Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	16.16667	0.033333	485.0000	0.000004	16.02324	16.31009
(1)IPP(L)	1.07500	0.028868	37.2391	0.000720	1.19921	0.95079
IPP(Q)	0.20417	0.030046	6.7951	0.020979	0.07489	0.33345
(2)MMI(L)	-0.85000	0.028868	-29.4449	0.001151	-0.97421	-0.72579
MMT(Q)	-1.72083	0.030046	-57.2728	0.000305	-1.85011	-1.59155
(3)Glicerol(L)	1.01250	0.020412	49.6022	0.000406	0.92167	1.10033
Glicerol(Q)	0.55417	0.030046	18.4438	0.002927	0.42489	0.68345
1L by 2Q	1.27500	0.040825	31.2310	0.001024	1.09934	1.45066
1Q by 2L	0.85000	0.040825	20.8207	0.002299	0.67434	1.02566
1L by 3L	1.22500	0.028868	42.4352	0.000555	1.10079	1.34921
2L by 3L	-1.05000	0.028868	-36.3731	0.000755	-1.17421	-0.92579

- Solubilidade

Effect Estimates; Var.: Solubilidade; R-sqr=.99740; Adj.:.99293 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0233333 DV: Solubilidade										
Factor	Effect	Std. Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	23.02500	0.044096	522.1579	0.000004	22.83527	23.21473	23.02500	0.044096	22.83527	23.21473
(1)IPP(L)	4.76667	0.113055	41.8661	0.000570	4.27679	5.25655	2.30333	0.056920	2.13039	2.62027
IPP(Q)	-2.79583	0.079495	-35.1700	0.000807	-3.13787	-2.45379	-1.39792	0.039747	-1.56894	-1.22690
(2)MMT(L)	0.67500	0.108012	6.2493	0.024663	0.21026	1.13974	0.33750	0.054006	0.10513	0.56987
MMT(Q)	-2.47083	0.079495	-31.0816	0.001034	-2.81287	-2.12879	-1.23542	0.039747	-1.40644	-1.06440
(3)Glicerol(L)	6.48333	0.113855	56.9438	0.000308	5.99345	6.97321	3.24167	0.056928	2.99673	3.48661
Glicerol(Q)	-1.62083	0.079495	-20.3891	0.002397	-1.96287	-1.27879	-0.81042	0.039747	-0.98144	-0.63940
1L by 2L	0.90000	0.152753	5.8919	0.027619	0.24276	1.55724	0.45000	0.076376	0.12138	0.77862
1L by 2Q	-2.45000	0.108012	-22.6826	0.001938	-2.91474	-1.98526	-1.22500	0.054006	-1.45737	-0.99263
1Q by 3L	1.02500	0.108012	9.4897	0.010923	0.56026	1.48974	0.51250	0.054006	0.28013	0.74487

Regr. Coefficients; Var.: Solubilidade; R-sqr=.99748; Adj.:.99293 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0233333 DV: Solubilidade						
Factor	Regressn Coeff.	Std. Err. Pure Err	t(2)	p	-95. % Cnf.Limt	+95. % Cnf.Limt
Mean/Interc.	18.43333	0.088192	209.0144	0.000023	18.05388	18.81279
(1)IPP(L)	0.75000	0.076376	9.8198	0.010212	0.42138	1.07862
IPP(Q)	2.79583	0.079495	35.1700	0.000807	2.45379	3.13787
(2)MMT(L)	0.33750	0.054006	6.2493	0.024663	0.10513	0.56987
MMT(Q)	2.47083	0.079495	31.0816	0.001034	2.12879	2.81287
(3)Glicerol(L)	3.92500	0.076376	51.3903	0.000378	3.59638	4.25362
Glicerol(Q)	1.62083	0.079495	20.3891	0.002397	1.27879	1.96287
1L by 2L	0.45000	0.076376	5.8919	0.027619	0.12138	0.77862
1L by 2Q	2.45000	0.108012	22.6826	0.001938	1.98526	2.91474
1Q by 3L	-1.02500	0.108012	-9.4897	0.010923	-1.48974	-0.56026

- Permeabilidade ao vapor de água

Effect Estimates; Var.:PVA; R-sqr=.9911; Adj.:.97923 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0033333 DV: PVA										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	4.55833	0.016667	273.5000	0.000013	4.48662	4.63004	4.553333	0.016667	4.486522	4.630044
(1)IPP(L)	0.52500	0.040825	12.8598	0.005993	0.34934	0.70066	0.262500	0.020412	0.174572	0.350323
IPP(Q)	-1.17083	0.030046	-38.9677	0.000658	-1.30011	-1.04155	-0.585417	0.015023	-0.650356	-0.520777
MMT(Q)	-0.64583	0.030046	-21.4946	0.002157	-0.77511	-0.51655	-0.322917	0.015023	-0.387556	-0.258277
(3)Glicerol(L)	0.90000	0.043033	20.9141	0.002278	0.71484	1.08516	0.450000	0.021517	0.357422	0.542573
Glicerol(Q)	0.17083	0.030046	5.6857	0.029569	0.30011	0.04155	0.085417	0.015023	0.150356	0.020777
1Q by 2L	-0.27000	0.038730	-6.9714	0.019962	-0.43664	-0.10336	-0.135000	0.019365	-0.218321	-0.051673
1L by 3L	0.25000	0.057735	4.3301	0.049414	0.00159	0.49841	0.125000	0.028863	0.000793	0.249207
1Q by 3L	0.22500	0.040825	5.5114	0.031380	0.40066	0.04934	0.112500	0.020412	0.200328	0.024672

Regr. Coefficients; Var.:PVA; R-sqr=.98266; Adj.:.95954 (Stat. f 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0033333 DV: PVA						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3.233333	0.033333	97.00000	0.000106	3.089912	3.376755
(1)IPP(L)	0.262500	0.020412	12.85982	0.005993	0.174672	0.350328
IPP(Q)	1.170833	0.030046	38.96769	0.000658	1.041555	1.300112
MMT(Q)	0.645833	0.030046	21.49463	0.002157	0.516555	0.775112
(3)Glicerol(L)	0.300000	0.028868	10.39230	0.009133	0.175793	0.424207
Glicerol(Q)	0.170833	0.030046	5.68568	0.029569	0.041555	0.300112
1Q by 2L	0.150000	0.028868	5.19615	0.035099	0.025793	0.274207
1L by 3L	0.125000	0.028868	4.33013	0.049414	0.000793	0.249207
1Q by 3L	0.225000	0.040825	5.51135	0.031380	0.049345	0.400655

- Transparência

Effect Estimates; Var.:V14; R-sqr=.94326; Adj.:.90071 (Stat. film) 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0433333 DV: V14										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	10.09231	0.057735	174.8039	0.000033	9.84389	10.34072	10.09231	0.057735	9.84389	10.34072
IPP(Q)	2.60385	0.108012	24.1059	0.001716	2.13911	3.06859	1.30192	0.054006	1.06355	1.53429
MMT(Q)	1.35385	0.108012	12.5342	0.006305	0.88911	1.81859	0.67692	0.054006	0.44455	0.90929
(3)Glicerol(L)	-2.95000	0.155158	-19.0128	0.002755	-3.61759	-2.28241	-1.47500	0.077579	-1.80380	-1.14120
1Q by 2L	0.91500	0.139642	6.5525	0.022508	0.31417	1.51583	0.45750	0.069821	0.15708	0.75792
1Q by 3L	0.75000	0.147196	5.0952	0.036427	0.11667	1.38333	0.37500	0.073598	0.05333	0.69167
2L by 3L	1.65000	0.208167	7.9253	0.015547	0.75433	2.54567	0.82500	0.104083	0.37717	1.27283

Regr. Coefficients; Var.:V14; R-sqr=.90856; Adj:.85775 (Stat. film 3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Runs; MS Pure Error=.0433333 DV: V14						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	12.73077	0.100000	127.3077	0.000062	12.30050	13.16103
IPP(Q)	-2.60385	0.108012	-24.1069	0.001716	-3.06859	-2.13911
MMT(Q)	-1.35385	0.108012	-12.5342	0.006305	-1.81859	-0.88911
(3)Glicerol(L)	-0.97500	0.104083	-9.3675	0.011205	-1.42283	-0.52717
1Q by 3L	-0.75000	0.147196	-5.0952	0.036427	-1.38333	-0.11667
2L by 3L	0.82500	0.104083	7.9263	0.015547	0.37717	1.27283