



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

DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS, BLENDS E BICAMADAS
UTILIZANDO DIFERENTES FONTES PROTEICAS

DAIANE NOGUEIRA

Prof^ª. Dr^ª. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2017

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

DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS, BLENDA E BICAMADAS
UTILIZANDO DIFERENTES FONTES PROTEICAS

DAIANE NOGUEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof^a. Dr^a. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2017

Ficha catalográfica

N778d Nogueira, Daiane.
Desenvolvimento de filmes biodegradáveis, blendas e bicamadas
utilizando diferentes fontes proteicas / Daiane Nogueira. – 2017.
125 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.
Orientadora: Dr^a. Vilásia Guimarães Martins.

1. Embalagem biodegradável 2. Proteínas 3. Glúten de trigo
4. Isolado proteico de pescada 5. Zeína de milho I. Martins, Vilásia
Guimarães II. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Daiane Nogueira e aprovada em 8 de agosto de 2017,
pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



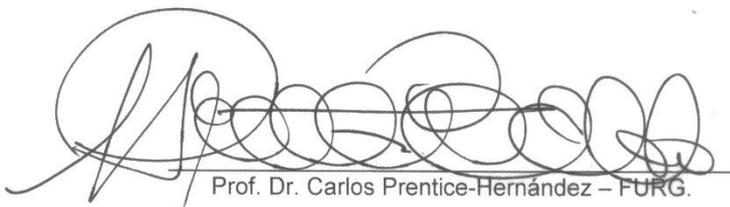
Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG.



Prof. Dr. Eliézer Ávila Gandra – UFPEL.



Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG.



Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández – FURG.

AGRADECIMENTOS

A mim, por ter tido força de vontade e coragem para lutar na vida e conseguir chegar até aqui.

A Deus, por me guiar pelos caminhos da vida e nunca me deixar só, colocando pessoas especiais em meu destino.

Ao meu esposo João Mateus P. Pieper, pelo apoio incondicional, por sempre acreditar em mim, pela ajuda, pelo incentivo, pelo amor, pela compreensão e principalmente pela paciência. Você é meu porto seguro.

Aos meus sogros João Paulo e Cristina Pieper, pelo incentivo, pelo carinho, pela paciência, pela ajuda e pelo amor.

Aos meus irmãos queridos, Douglas e Jonatas, por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amados avós, Adão e Vilma, obrigada pelo carinho e dedicação que dispuseram para o meu crescimento.

As minhas amigas/irmãs que Deus presenteou-me com muita generosidade:

Bárbara, obrigada pela paciência, pelos conselhos, por sempre acreditar em mim, pelo incentivo, pelo carinho e amizade verdadeiros, pela casa e pela mãe que tu divides comigo, por ter me proporcionado momentos únicos e nunca antes vivenciados;

Fabi (minha irmã que nasceu de dia), obrigada pelo ombro sempre disponível a acolher minhas lágrimas quando mais precisei, pelas palavras de conforto e carinho, pela amizade Paola (minha gêmea separada na maternidade), obrigada pela amizade sincera e verdadeira, pelos conselhos, pelo carinho, pela ajuda na execução do meu projeto e pelos momentos de descontração e alegria;

Pâmela, pela amizade espontânea e verdadeira, pelos momentos compartilhados, pelas gargalhadas contagiantes que me fazem rir mesmo que eu não queira;

Jú, obrigada pelos conselhos sábios e experientes, pela orientação no laboratório, pelas caronas, pelo incentivo, pela amizade e carinho a mim dedicados;

Vivi, por me receber de braços abertos desde o primeiro dia, pelo compartilhamento do teu saber, pela ajuda na pesquisa, pela amizade e carinho;

Pri e Karen, pela convivência no AP mais 'fitness' da cidade, pela paciência, pelas conversas, pelo apoio, pelo carinho, pelas parcerias de treino, pelos passeios e tantos outros momentos de alegrias e tristezas compartilhados;

Sabrina, pela amizade linda, pela ajuda nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração e felicidade.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vilásia Guimarães Martins, pela orientação, ensinamentos compartilhados, paciência e compreensão no momento que mais precisei.

À Sabrine Aquino, pela paciência de explicar quantas vezes for necessário, pela ajuda durante todo o período do mestrado, pela amizade, pelo carinho e incentivo.

À Dr^a. Michele Moraes de Souza, pela paciência de desenhar se preciso for para que eu entendesse, pelos ensinamentos compartilhados, pela ajuda na prática e na escrita, pela amizade e pelas caronas.

Aos meus professores da Graduação pelo incentivo, confiança e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela paciência e pelos momentos de conhecimento, alegria e descontração.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, pelos momentos de descontração, carinho e amizade.

A todos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos conhecimentos compartilhados, amizade e sensibilidade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Região Sul (CEME-Sul) pela disponibilidade de equipamentos e funcionários para realização de análises.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições ao trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande, pela oportunidade de aprendizagem.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o êxito na execução deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III	41
ARTIGO I - Efeito da utilização de diferentes matérias-primas proteicas no desenvolvimento de filmes e blendas biodegradáveis	43
Tabela 1 - Composição proximal de zeína de milho (ZM), glúten de trigo (GT), aparas de pescada (AP) e isolado proteico (IP)	58
Tabela 2 - Espessura, opacidade e diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes individuais e blendas	61
Tabela 3 - Resistência a tração (RT), alongamento na ruptura (AR), solubilidade em água (SOL) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes individuais e das blendas	63
Tabela 4 - Temperatura de transição vítrea (T_g), de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e perda de massa até o ponto de fusão obtida por análise termogravimétrica (TGA) dos filmes e blendas	66
Tabela 5 - Perda de massa dos filmes e blendas durante o período de biodegradação.....	73
ARTIGO II - Filmes bicamadas elaborados a partir de proteínas de glúten de trigo, zeína de milho e isolado proteico de pescada.....	79
Tabela 1 - Composição proximal de zeína de milho (ZM), glúten de trigo (GT), aparas de pescada (AP) e isolado proteico (IP).	91
Tabela 2 - Espessura, opacidade e diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes individuais e bicamadas.	93
Tabela 3 - Resistência a tração (RT), alongamento até a ruptura (AR), solubilidade em água (SOL) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes individuais e das bicamadas.	95
Tabela 4 - Temperatura de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e perda de massa até o ponto de fusão obtida por análise termogravimétrica (TGA) dos filmes e bicamadas.....	97
Tabela 5 - Perda de massa dos filmes e blendas durante o período de biodegradação.....	102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II.....	25
Figura 1 - Base bioquímica para a obtenção do isolado proteico.....	31
CAPÍTULO III.....	41
ARTIGO I - Efeito da utilização de diferentes matérias-primas proteicas no desenvolvimento de filmes e blendas biodegradáveis.....	43
Figura 1 - Curva de solubilidade do músculo de pescada	59
Figura 2 - Filmes e blendas poliméricas de proteínas musculares de pescada, glúten de trigo e zeína de milho.....	62
Figura 3 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo	67
Figura 4 - Análise termogravimétrica (TGA) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo	67
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C), blenda zeína e glúten de trigo (D) e blenda pescada e glúten de trigo (E)	69
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura lateral de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C1 e C2), blenda zeína e com glúten de trigo (D1 e D2) e blenda pescada e glúten de trigo (E).....	70
Figura 7 - Difratoograma de raios X de filmes de zeína, pescada, glúten de trigo, blenda de zeína e glúten de trigo e blenda de pescada e glúten de trigo	72
ARTIGO II - Filmes bicamadas elaborados a partir de proteínas de glúten de trigo, zeína de milho e isolado proteico de pescada.....	79
Figura 1 - Bicamadas com filme de glúten em baixo (A) e com o filme de glúten por cima do filme de isolado de pescada (B).....	92
Figura 2 - Filmes e bicamadas poliméricas de proteínas.....	94
Figura 3 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo	98
Figura 4 - Análise termogravimétrica (TGA) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo	99

Figura 5- Microscopia eletrônica de varredura superficial de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C), bicamada de pescada e zeína (D), bicamada de zeína e glúten (E) e bicamada pescada e glúten (F) 100

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura lateral de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C), bicamada de pescada e zeína (D), bicamada de zeína e glúten (E) e bicamada pescada e glúten 101

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO II.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 PROTEÍNAS	27
2.2 ZEÍNA DE MILHO (<i>Zea mays</i>).....	27
2.3 GLÚTEN DE TRIGO (<i>Triticum spp.</i>).....	28
2.4 PROTEÍNAS DE PESCADA (<i>Cynoscion guatacupa</i>)	29
2.5 ISOLADO PROTEICO	30
2.6 PLASTIFICANTES	32
2.7 FILMES BIODEGRADÁVEIS.....	33
2.8 BLENDA POLIMÉRICAS	34
2.9 FILMES BICAMADAS	36
2.10 ELABORAÇÃO DE FILMES	36
2.11 PROPRIEDADES DOS FILMES	37
2.12 BIODEGRADABILIDADE.....	39
CAPÍTULO III	41
APRESENTAÇÃO.....	43
ARTIGO I.....	45
EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS PROTEICAS NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES E BLENDA BIODEGRADÁVEIS.....	45
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 MATERIAL	50

2.2 MÉTODOS	51
2.2.1 Obtenção das proteínas de pescada	51
2.2.2 Caracterização das matérias-primas e do isolado proteico.....	52
2.2.3 Elaboração dos filmes individuais.....	52
2.2.4 Elaboração dos filmes de isolado proteico de pescada	52
2.2.5 Elaboração dos filmes de glúten de trigo	53
2.2.6 Elaboração dos filmes de zeína de milho	53
2.2.7 Elaboração das blendas	53
2.2.8 Caracterização dos filmes.....	54
2.2.8.1 Espessura.....	54
2.2.8.2 Solubilidade em água	54
2.2.8.3 Permeabilidade ao vapor d'água	54
2.2.8.4 Propriedades óticas.....	55
2.2.8.5 Propriedades mecânicas	55
2.2.8.6 Propriedades térmicas	56
2.2.8.7 Propriedades microestruturais	56
2.2.9 Biodegradabilidade dos filmes e blendas em solo	57
2.2.9.1 Caracterização do solo	57
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS.....	58
3.2 SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE PESCADA.....	59
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES e blendas	60
3.3.1 Espessura e propriedades óticas	60
3.3.2 Propriedades mecânicas, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água ..	62
3.3.3 Propriedades térmicas	66
3.3.4 Propriedades microestruturais	68

3.4 Biodegradabilidade dos filmes e blendas em solo.....	72
4 CONCLUSÃO.....	73
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ARTIGO II	79
FILMES BICAMADAS BIODEGRADÁVEIS ELABORADOS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE GLÚTEN DE TRIGO, ZEÍNA DE MILHO E ISOLADO PROTEICO DE PESCADA..	79
RESUMO	81
1 INTRODUÇÃO.....	83
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1 MATERIAL	84
2.2 MÉTODOS.....	84
2.2.1 Obtenção do isolado proteico	84
2.2.2 Caracterização das matérias-primas e do isolado proteico.....	85
2.2.3 Elaboração dos filmes individuais.....	85
2.2.4 Elaboração dos filmes de isolado proteico de pescada.....	85
2.2.5 Elaboração dos filmes de glúten de trigo	86
2.2.6 Elaboração dos filmes de zeína de milho	86
2.2.7 Elaboração das bicamadas	86
2.2.8 Caracterização dos filmes.....	87
2.2.8.1 Espessura	87
2.2.8.2 Solubilidade em água.....	87
2.2.8.3 Permeabilidade ao vapor d'água.....	88
2.2.8.4 Propriedades óticas	88
2.2.8.5 Propriedades mecânicas.....	88
2.2.8.6 Propriedades térmicas.....	89
2.2.8.7 Propriedades microestruturais	89
2.2.9 Biodegradabilidade dos filmes em solo.....	90
2.2.9.1 Caracterização do solo.....	91
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	91

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS	91
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	92
3.2.1 Espessura e propriedades óticas	93
3.3.2 Propriedades mecânicas, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água ..	95
3.3.3 Propriedades térmicas	97
3.3.4 Propriedades microestruturais	99
3.3.5 Biodegradabilidade dos filmes em solo	101
4 CONCLUSÃO	102
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
CAPÍTULO IV	107
4 CONCLUSÃO GERAL	109
CAPÍTULO V	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

CAPÍTULO I

RESUMO

O uso de biopolímeros obtidos a partir de fontes renováveis na elaboração de filmes biodegradáveis, é uma alternativa para aplicações inovadoras na proteção e preservação de alimentos, assim como na redução do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado de embalagens sintéticas. O presente estudo teve como objetivo geral a elaboração de filmes individuais, blendas e bicamadas a partir de proteínas de glúten de trigo, de zeína de milho e de isolado proteico de pescada (*Cynoscion guatacupa*). Inicialmente, foi realizado isolamento das proteínas de pescada (aparas frescas). Tanto as aparas, quanto o isolado proteico obtido delas e as demais proteínas foram caracterizadas quanto a sua composição proximal. A partir dessas proteínas, foram elaborados através do método de *casting*, os filmes individuais, blendas e bicamadas, que foram avaliados quanto a espessura, propriedades mecânicas de resistência à tração (RT) e alongamento na ruptura (AR), cor e opacidade, solubilidade em água (SOL), permeabilidade ao vapor d'água (PVA), microestrutura, propriedades térmicas e biodegradação em solo. Os filmes de isolado proteico de pescada (FP), a blenda de isolado proteico de pescada com glúten (BL P+G) e a bicamada de isolado proteico de pescada com glúten (BI P+G) apresentaram maior resistência a tração, enquanto o filme de glúten (FG) exibiu maior alongamento na ruptura e a solubilidade mais baixa. O filme de zeína (FZ) apresentou propriedades mecânicas deficientes, e foi o único que não se degradou 100% em 60 dias no solo. A BL P+G e a BI P+G mostraram ser as matrizes mais promissoras para aplicação como material de embalagem devido as propriedades em geral exibirem os resultados mais requeridos para serem utilizadas como embalagens para diferentes aplicações. A BL P+G apresentou AR, SOL, PVA e propriedades térmicas melhores quando comparada a BI P+G. Entretanto, a RT de ambas foi muito próxima, assim como as propriedades microestruturais, onde ambas apresentaram superfícies irregulares e com poros, porém, mais lisas quando comparadas as demais matrizes desenvolvidas. Todas as matrizes apresentaram biodegradabilidade (BOD) progressiva, sendo que, em 10 dias de análise, o FP, o FG e a BL P+G já estavam 100% degradados. A BI P+G só exibiu sua completa biodegradação após 30 dias de análise. Estes resultados de BOD, juntamente com os demais resultados, podem ser de grande importância no que diz respeito à aplicação desses filmes, visto que, um curto ou um longo período de biodegradação pode ser requerido, dependendo da aplicação a que se destina a matriz. O isolado proteico de pescada e o glúten de trigo apresentaram-se promissores no desenvolvimento tanto dos filmes individuais quanto das blendas e bicamadas com boas propriedades. A BL P+G e a BI P+G apresentaram os resultados mais promissores para serem aplicadas no desenvolvimento de embalagens de alimentos.

Palavras-chave: Embalagem biodegradável. Proteínas. Glúten de trigo. Isolado proteico de pescada. Zeína de milho.

ABSTRACT

Development of biodegradable films, blends and bilayers using different protein sources

The use of biopolymers obtained from renewable sources in the preparation of biodegradable films is an alternative for innovative applications in the protection and preservation of food, as well as in reducing the environmental impact caused by the inappropriate disposal of synthetic packaging. The present study has as general objective the elaboration of individual films, blends and bilayers from wheat gluten proteins, maize zein and hake (*Cynoscion guatacupa*) protein isolate. Initially, isolation of hake proteins (fresh chips) was carried out. Both the chips, their protein isolate and the other proteins were characterized by their proximal composition. From these proteins, the individual films, blends and bilayers were developed through the casting method, which were evaluated for thickness, mechanical properties of tensile strength (TS) and elongation at break (E), color and opacity, water solubility (SOL), water vapor permeability (WVP), microstructure, thermal properties and soil biodegradation. Films from protein isolate (PF), blends from gluten with protein isolate (BL P+G) and bilayers from gluten with protein isolate (BI P+G) showed higher tensile strength, whereas the gluten film (GF) exhibited higher elongation at break and lower solubility. The zein film (ZF) had poor mechanical properties and was the only one that did not degrade 100% in 60 days in the soil. BL P+G and BI P+G proved to be the most promising matrices for application as packaging material due to the properties in general exhibit the most required results to be used as packaging for different applications. The BL P+G presented better E, SOL, WVP and thermal properties when compared to BI P+G. However, the TS of both was very close, as well as the microstructural properties, where both presented irregular surfaces and with pores, however, they were smoother when compared to the other developed matrices. All matrices showed progressive biodegradability (BOD), and in 10 days of analysis, the PF, GF and BL P+G were 100% degraded. The BI P+G only showed its complete biodegradation after 30 days of analysis. These BOD results, along with the other results, may be of great importance with regard to the application of these films, since a short or a long period of biodegradation may be required, depending on the intended application of the matrix. Protein isolate from hake and wheat gluten were promising in the development of individual films as well as in blends and bilayers with good properties. The BL P+G and the BI P+G presented the most promising results for to be applied in the development of food packaging.

Keywords: Biodegradable packaging. Corn zein. Hake protein isolate. Proteins. Wheat gluten.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As embalagens de alimentos possuem, como principal função, manter a qualidade e segurança dos produtos durante seu armazenamento e transporte, além de prolongar sua vida útil. Este processo ocorre pelo impedimento do contato com fatores ou condições desfavoráveis, tais como micro-organismos, contaminantes químicos, oxigênio, umidade, entre outros (RHIM; PARK; HA, 2013).

Mais de trinta diferentes tipos de polímeros estão sendo utilizados como materiais de embalagens plásticas destinadas ao acondicionamento de alimentos, isso ocorre devido ao baixo custo e grande facilidade de processamento de alguns desses materiais (FABRIS; FREIRE; REYES, 2006). As embalagens plásticas obtidas a partir de polímeros sintéticos têm como principal matéria prima a nafta, derivada do óleo bruto e do gás natural provenientes do petróleo (SIRACUSA et al., 2008). O impacto ambiental causado pelos materiais não degradáveis dessas embalagens têm gerado preocupação com soluções inovadoras para este problema (WANG; RHIM, 2015). O setor industrial e pesquisadores buscam desenvolver embalagens biodegradáveis utilizando materiais à base de polímeros naturais como polissacarídeos, lipídeos e proteínas (ZOLFI et al., 2014).

O uso de biopolímeros na elaboração de filmes biodegradáveis é uma alternativa para aplicações inovadoras na proteção e preservação de alimentos. Inúmeras proteínas têm sido utilizadas como potenciais agentes formadores de filmes, tais como zeína de milho, glúten de trigo, proteínas do soro, da clara de ovo, colágeno, gelatina e miofibrilares de pescado (MASTROMATTEO et al., 2008). Alguns destes filmes apresentam boas propriedades de barreira ao oxigênio e aromas, mas apresentam propriedades mecânicas deficientes, e alta permeabilidade ao vapor de água. Assim, filmes bicamadas ou blendas poliméricas, os quais combinam as propriedades de dois ou mais materiais em uma única estrutura de diferentes formas, apresentam-se como uma estratégia para melhorar a funcionalidade dos filmes de proteínas (CONDÉS et al., 2015).

Muitas proteínas podem sofrer uma grande variedade de interações intermoleculares e, assim, serem utilizadas na elaboração de filmes biodegradáveis (NIE et al., 2015). Porém, a baixa resistência ao vapor de água de filmes de proteína e sua resistência mecânica menor em comparação aos polímeros sintéticos, limitam a sua aplicação em embalagens de alimentos. Assim, vários estudos vêm sendo realizados em uma tentativa de

melhorar o desempenho dos filmes de proteína (CINELLI et al., 2014; CHO; LEE; RHEE, 2010; FERREIRA; RUIZ; GASPAR-CUNHA, 2014; GONZÁLEZ; IGARZABAL, 2013).

Uma alternativa que vem sendo estudada é a elaboração de filmes bicamadas, uma técnica que produz uma única estrutura constituída por dois ou mais polímeros individuais, com o objetivo de combinar as propriedades desses materiais, melhorando assim as suas características gerais (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2009).

De acordo com Cho, Lee e Rhee (2010), as proteínas do glúten do trigo e a zeína do milho possuem propriedades viscoelásticas e ligações únicas quando aquecidas, apresentando-se assim com elevado potencial para desenvolvimento de embalagens biodegradáveis. O glúten de trigo tem sido utilizado, devido às suas interessantes propriedades de formação de película, baixa solubilidade em água, baixo custo e disponibilidade, e por ser um coproduto da indústria do amido de trigo (ZUBELDÍA; ANSORENA; MARCOVICH, 2015). A zeína é obtida a partir do glúten do milho, que é um subproduto da moagem úmida do milho (DICK, 2014), de baixo valor nutritivo e econômico, sendo muitas vezes descartado ou empregado na alimentação animal (CINELLI et al., 2014).

No município de Rio Grande (RS), a captura de pescado é considerada uma atividade tradicional. A cidade abriga diferentes indústrias pesqueiras que são responsáveis pelo descarte de subprodutos da atividade (CENTENARO; MELLADO, 2008). Dentre estes, encontram-se as aparas de filé, subproduto oriundo da etapa de filetagem na industrialização da pescada, que atualmente, em conjunto com os demais subprodutos e também espécies de baixo valor comercial, são destinados à fabricação de farinha de pescada.

Percebendo a necessidade de maiores estudos para o desenvolvimento de novos materiais, assim como o melhoramento dos já existentes que possam ser aplicados a embalagens de alimentos, objetiva-se com o presente estudo avaliar diferentes fontes de proteínas para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis com múltiplas camadas e blendas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar filmes individuais, blendas e bicamadas a partir de proteínas de origem vegetal e animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar filmes e blendas a partir de proteínas de pescada, glúten de trigo e zeína;
- Elaborar filmes bicamadas a partir de proteínas de pescada, glúten de trigo e zeína;
- Caracterizar os filmes obtidos quanto às suas propriedades mecânicas, ópticas, morfológicas, térmicas e químicas;
- Avaliar a biodegradabilidade dos filmes proteicos.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROTEÍNAS

Proteínas são moléculas complexas compostas por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e, eventualmente, por outros elementos como enxofre, ferro, cobre, fósforo e zinco (ORDÓÑEZ, 2005). São polímeros complexos compostos por 21 aminoácidos distintos, interligados por ligações peptídicas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os aminoácidos estão unidos pela formação de ligações covalentes, entre um grupo α - carboxila de um aminoácido e o grupo α - amina do próximo. Conseqüentemente, a água é eliminada do processo obtendo-se resíduos de aminoácidos ligados entre si, sendo essa ligação denominada ligação peptídica. A proteína é composta por aminoácidos que são ligados por ligações peptídicas para formar uma cadeia polipeptídica (CAMPBELL, 2000).

As proteínas existem em todas as células vivas, apresentando-se como um dos principais constituintes da pele, tecido nervoso, tendões, músculos e cabelos. Também estão presentes em plantas para fornecer a estrutura e a atividade biológica (AHMED et al., 2012). São recursos renováveis, biodegradáveis, com grande potencial para melhorar a qualidade e a estabilidade de uma grande variedade de produtos alimentares (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

Os aminoácidos diferem entre si, devido a sua diferente massa molecular, carga e polaridade característica. As propriedades químicas e o tamanho da cadeia lateral, bem como a sequência de aminoácidos, afetam a conformação da molécula, a atividade biológica e nutricional e as propriedades funcionais da proteína (ARAÚJO, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Estas são heteropolímeros com propriedades termoplásticas, constituídas de aminoácidos polares e apolares, que são capazes de formar numerosas ligações intermoleculares, as quais permitem ampla variação nas propriedades funcionais dos materiais resultantes (DAMODARAN; PARKING; FENNEMA, 2010; HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

2.2 ZEÍNA DE MILHO (*Zea mays*)

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu 24.319.708 toneladas de milho no de 2016 e para o ano de 2017 são esperadas

29.662.612 toneladas de milho (IBGE, 2017). Foi a partir da farinha de milho que os estudos para extração da zeína começaram, obtida da moagem seca do grão inteiro, com rendimento de 5 a 6% de extração de zeína. Osborne, em 1891, foi o primeiro a registrar uma patente nos EUA para extração de zeína, a partir da moagem úmida com formação de glúten do milho, esse método, a partir do glúten, alcançou maior rendimento, de 30 a 40% de zeína (LAWTON, 2002; PAPALI; LONDERO, 2015).

As zeínas, ou prolaminas, são proteínas de reserva compostas por vários polipeptídeos que representam mais de 50% da massa total das proteínas presentes no endosperma do milho (*Zea mays*) (OZCALIK; TIHMINLIOGLU, 2013). Essas proteínas têm baixa qualidade nutricional e são indicadas para usos em aplicações diversas que não alimentícias, principalmente em farmacêutica como material de encapsulamento de fármacos, na impermeabilização de papeis e embalagens cartonadas e associadas a polímeros sintéticos para minimizações de contato e deteriorações em alimentos (FORATO et al., 2013). Além disso, essas proteínas apresentam alto grau de polimerização, superiores aos encontrados nas poliamidas e no poliéster (CHEN; YE; LIU, 2014).

As zeínas são consideradas proteínas globulares e constituídas de frações classificadas de acordo com sua massa relativa (M_r) e solubilidade, como zeínas α , γ , β e δ . Essas proteínas contêm 10 segmentos helicoidais sucessivos dispostos de forma antiparalela que são estabilizados por ligações de hidrogênio (GAO et al., 2017). Por serem ricas em resíduos de aminoácidos apolares (leucina, prolina, alanina, glicina, valina e outros), as zeínas α são altamente hidrofóbicas, portanto insolúveis em água, mas solúveis em meios alcoólicos (TIHMINLIOGLU; ATIK; ÖZEN, 2010). Por conseguinte, filmes produzidos a partir da diluição de zeínas puras apresentam também caráter hidrofóbico, o que pode ser potencialmente interessante para aplicações como revestimentos ou barreiras à umidade e ao vapor de água. De um modo geral, filmes à base de zeínas apresentam também uma boa barreira ao transporte de oxigênio, dióxido de carbono e demais compostos voláteis (CHEN; YE; LIU, 2014; FORATO et al., 2013; GAO et al., 2017).

2.3 GLÚTEN DE TRIGO (*Triticum Spp.*)

O glúten de trigo é um subproduto da produção de amido de trigo, e atualmente é utilizado principalmente na indústria de panificação e como ração animal (NORDQVIST; KHABBAZ; MALMSTRÖM, 2010). O glúten de trigo está disponível em grandes quantidades, uma vez que é um subproduto da produção de etanol com base em trigo (KHOSRAVI et al.,

2015). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), a estimativa da produção de trigo para 2017 alcança 6.475.841 toneladas, redução de 3,6% frente ao ano anterior. A área a ser plantada deve crescer 14,7%, enquanto que o rendimento médio deve cair 16,0%. Em 2016, o clima foi favorável às lavouras de trigo na Região Sul e obtidos rendimentos elevados no Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo que esses estados responderam por 91,4% da safra nacional do cereal.

O glúten é definido como uma fração proteica do trigo, que compreende as proteínas de armazenamento e ocorre exclusivamente no endosperma amiláceo dos grãos, constituindo cerca de 70-80 % de proteínas totais dos grãos (SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2015).

As proteínas do glúten são divididas em duas frações, glutenina e gliadinas, de acordo com as diferenças de solubilidade em uma proporção em massa de aproximadamente 60/40, respectivamente. A fração de glutenina contém principalmente proteínas monoméricas solúveis apenas em soluções alcoólicas. As gliadinas contêm ligações dissulfeto intermoleculares, onde o rompimento destas ligações permite que haja o desdobramento da molécula de proteína (FERREIRA; RUIZ; GASPAR-CUNHA, 2014). Estas só são parcialmente solúveis em ácidos diluídos e bases ou solventes que contenham detergentes ou agentes de desagregação (SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2015).

De acordo com Palmu (2003), para a formação de filmes de glúten é necessária inicialmente a dispersão deste em solução de etanol e água, para que haja a redução e quebra das ligações dissulfeto (S-S). A mistura mecânica também ajuda nessa dispersão, porém, de acordo com Okamoto (1978), a redução das ligações dissulfeto são completamente atingidas em ambiente alcalino ou pela da adição de agentes redutores como mercaptoetanol e sulfito de sódio.

2.4 PROTEÍNAS DE PESCADA (*Cynoscion guatacupa*)

A pescada é comercializada na forma de filé, onde na etapa de filetagem, obtêm-se as aparas de pescada. Este é um subproduto oriundo da industrialização, e que, atualmente, em conjunto com os demais subprodutos e também espécies de baixo valor comercial, são destinados a fabricação de farinha de pescado (RAI et al., 2010; TASKAYA e JACKZYNSKI, 2009).

As proteínas musculares do pescado apresentam a vantagem de possuírem eleva do valor biológico, decorrente da sensibilidade à hidrólise e de composição balanceada em aminoácidos, particularmente daqueles que costumam ser os limitantes em proteínas de origem

vegetal, como a metionina e a cisteína (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009).

De acordo com Ordóñez (2005), as proteínas do pescado, podem ser divididas em sarcoplasmáticas, miofibrilares e insolúveis ou do estroma dependendo de sua solubilidade. O músculo do pescado possui proteínas miofibrilares que correspondem a 66 - 77% das proteínas totais, proteínas sarcoplasmáticas que constituem cerca de 35% das proteínas totais do músculo, e as proteínas do estroma (tecido conectivo), que são o colágeno e a elastina, tidos como resíduo da extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares (SALGADO, 2015).

Estudos indicam que as proteínas animais possuem excelente capacidade de formação de filmes, especificamente as proteínas miofibrilares provenientes de carne bovina e de pescado. De modo geral, os filmes formados com essas proteínas apresentam propriedades funcionais interessantes (GARCIA; SOBRAL, 2005; SOBRAL et al., 2001; MONTERREY; SOBRAL, 1998). As proteínas têm uma estrutura específica (derivada de 20 diferentes monômeros – aminoácidos) que conferem uma gama maior de propriedades funcionais e potenciais por formar ligações intra e intermoleculares diferindo nas posições, tipos e energia (CUQ et al., 1997).

2.5 ISOLADO PROTEICO

As proteínas de pescado, tem sido utilizadas para o desenvolvimento de produtos de elevado valor agregado. Esses podem contribuir no melhoramento das propriedades funcionais e no enriquecimento proteico, como novas alternativas para o desenvolvimento de alimentos através do uso de isolados proteicos, proteínas miofibrilares, surimi, entre outros (CENTENARO et al., 2007; FREITAS et al., 2011; LEMPEK; MARTINS; PRENTICE, 2007; PIOTROWICZ, 2012).

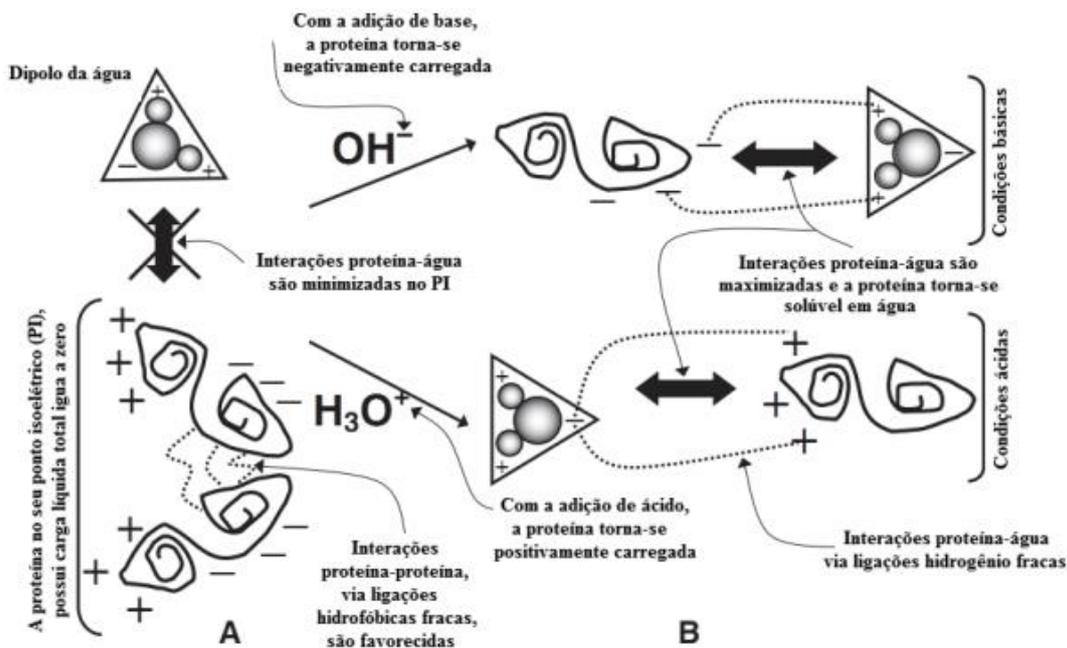
O processo de isolamento de proteínas por método químico baseia-se no princípio de que a solubilidade de um material proteico homogeneizado em água é afetada pelo pH da mistura. Em condições extremamente ácidas ou alcalinas, ocorrem fortes alterações positivas e negativas que conduzem à repulsão ou à interação com a água, levando à solubilização (NOLSOE; UNDELAND, 2009).

O isolamento das proteínas do músculo de pescado, com a eliminação simultânea de lipídios e proteínas insolúveis, foi proposto por Hultin e Kelleher (2000). Os isolados proteicos são comumente obtidos pelo processo de variação de pH (*pH- shifting process*) por solubilização proteica por via química (ácida ou alcalina), a partir de co-produtos, músculo ou

de pescado inteiro, seguida de precipitação em seu ponto isoelétrico (pI) (MATAK; TAHERGORABI; JACZYNSKI, 2015; NOLSOE; UNDELAND, 2009). A Figura 1 explica bioquimicamente a obtenção do isolado proteico pelo do método de variação de pH.

Segundo Matak, Tahergorabi e Jaczynski (2015) (Figura 1), quando um ácido é adicionado em uma solução proteica, ocorre a formação de íons hidrônio (H_3O^+), e a consequente protonação de algumas cadeias laterais carregadas, tais como os resíduos de glutamyl ou aspartil, resultando em um aumento da carga líquida positiva da solução. Semelhantemente, a adição de base (OH^-) na solução resulta na desprotonação, das cadeias como a tirosil, lisil, cistenil, triptofanil e arginil entre outras, contribuindo para um aumento de carga negativa (GEHRING et al., 2011; NOLSOE; UNDELAND, 2009).

Figura 1 - Base bioquímica para a obtenção do isolado proteico



Onde: A) No pI as interações proteína-água são mínimas, enquanto que as interações proteína-proteína são máximas, através ligações hidrofóbicas fracas; B) Com a adição de ácido ou base, as interações proteína-água aumentam, resultando na solubilidade proteica. (Fonte: Adaptada de Gehring et al., 2011; Matak, Tahergorabi e Jaczynski, 2015).

De acordo com Matak, Tahergorabi e Jaczynski (2015), quando as proteínas possuem cargas líquidas, positivas ou negativas, iniciam uma interação eletrostática proteína-água, o que diminui as interações hidrofóbicas proteína-proteína. Conseqüentemente as moléculas de proteína se tornam mais polares, ocorrendo um acréscimo no conteúdo de água associada e em torno da mesma, tornando-as solúveis em água (GEHRING et al., 2011; NOLSOE; UNDELAND, 2009).

No entanto, é possível ajustar o pH de uma solução proteica, de modo que o número de cargas negativas sobre a superfície da proteína seja igual ao número de cargas positivas e, por conseguinte, a molécula de proteína assume uma carga eletrostática líquida igual a zero. Esse ponto é denominado ponto isoelétrico (pI) da proteína, o qual depende do tipo de matéria-prima utilizada, mas para um grande número de proteínas encontra-se entre os pHs 4,5 e 6,5 (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; GEHRING et al., 2011; MATAK; TAHERGORABI; JACZYNSKI, 2015). A solubilidade da proteína depende não apenas das propriedades físico-químicas da molécula, mas também do pH, da força iônica, da temperatura e do tipo do solvente (ORDÓÑEZ, 2005).

O comportamento isoelétrico das proteínas musculares de pescado, pode ser usado para recuperar proteínas do processamento de animais aquáticos ou de co-produtos, assim como de espécies de baixo valor agregado (MATAK; TAHERGORABI; JACZYNSKI, 2015). Segundo Kristinsson e Liang (2006), materiais indesejáveis como a pele, ossos, microorganismos, lipídios de membrana e outros resíduos são removidos durante o processo de centrifugação. Nos processos de solubilização ácida ou alcalina da proteína, quando o músculo é submetido a pH extremos, as proteínas são parcialmente desdobradas. Desta forma, ocorrem alterações na parte estrutural e conformacional das proteínas, as quais conduzem a diferentes propriedades quando recuperadas (KRISTINSSON; HULTIN, 2003). O processamento do isolado proteico de pescado em pH alcalino, permite a recuperação de proteínas com propriedades funcionais melhores, entre estas, textura e gelificação. Entretanto, a solubilização ácida resulta em um acréscimo no rendimento proteico. Além da solubilização ácida, muitos fatores são responsáveis por essa característica, tais como, a fonte muscular, frescor dos filés de pescado, adição de água, pH de solubilização e precipitação, dentre outros (MARMON; UNDELAND, 2013; NOLSOE; UNDELAND, 2009).

2.6 PLASTIFICANTES

Os plastificantes são aditivos utilizados na elaboração de filmes com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas, sensoriais e de proteção (ZUBELDÍA; ANSORENA; MARCOVICH, 2015). Estas pequenas moléculas interagem com as cadeias do polímero, reduzindo as forças intermoleculares que mantém as cadeias em conjunto, suaviza a rigidez natural do filme e aumenta a mobilidade entre as cadeias poliméricas, resultando na melhoria das propriedades mecânicas (OZCALIK; TIHMINLIOGLU, 2013). Assim, os plastificantes asseguram a formação dos filmes e ajudam a evitar que estes sofram danos durante o

subsequente manuseio e armazenamento, o que poderia diminuir as propriedades de barreira do filme (ZUBELDÍA; ANSORENA; MARCOVICH, 2015).

Além da água, que é considerada o principal solvente na tecnologia de polímeros, pois reduz a temperatura de transição vítrea (T_g) do material, outros plastificantes comumente utilizados são monossacarídeos, oligossacarídeos (glicose, frutose e sacarose), lipídios (ácidos graxos e tensoativos) e polióis (sorbitol e glicerol) (OZCALIK; TIHMINLIOGLU, 2013). Os polióis têm sido considerados particularmente eficazes para uso como plastificantes em polímeros hidrofílicos. O glicerol é uma molécula altamente higroscópica, de baixa massa molecular, que tem sido amplamente utilizado no processamento termoplástico de proteínas. Esse elevado efeito de plastificação têm sido atribuído à facilidade com que o glicerol têm de se inserir e posicionar-se dentro da rede tridimensional proteica (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008). Este plastificante possui as vantagens de ser de baixo custo, não tóxico e possui elevado ponto de ebulição (AHMED et al., 2012).

2.7 FILMES BIODEGRADÁVEIS

O interesse na utilização de materiais biodegradáveis com possível aplicação a embalagens de alimentos tem aumentado notavelmente nos últimos anos. O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis a partir de materiais naturais reduz a necessidade de sintetizar polímeros à base de petróleo, eliminando os efeitos negativos produzidos por este sobre o meio ambiente (GONZÁLEZ; STRUMIA; IGARZABAL, 2011).

Os polímeros biodegradáveis são aqueles constituídos por materiais que podem ser degradados pela ação de organismos vivos, tais como enzimas, bactérias e fungos, gerando os produtos finais do processo de degradação, sendo estes CO_2 , H_2O e biomassa (sob condições aeróbicas), e hidrocarbonetos, metano e biomassa (sob condições anaeróbicas) (PLÁCIDO, 2007).

Polímeros naturais como amido, celulose e proteínas têm atraído a atenção nas últimas décadas. Estes materiais têm encontrado inúmeras aplicações em produtos biodegradáveis, pois, além de versáteis e ecologicamente corretos, apresentam propriedades que podem substituir, em certa parcela, alguns polímeros sintetizados a partir do petróleo (LUCKACHAN; PILLAI, 2011).

As elaborações de filmes, de um modo geral, envolvem um agente formador de filmes (macromoléculas), um agente plastificante, um solvente e um ajustador de pH. Quando comparados aos demais polímeros naturais, os filmes à base de proteínas apresentam-se

hidrófilos, com boa resistência mecânica, boas propriedades de barreira a oxigênio e CO₂, mas uma baixa barreira ao vapor de água (PLÁCIDO, 2007).

Durante a formação de filmes à base de proteínas, primeiramente ocorre a ruptura das pontes intermoleculares de baixa energia que estabilizam o polímero em seu estado natural. Após, ocorre o rearranjo e orientação das cadeias poliméricas e, por fim, a formação de uma matriz tridimensional estabilizada por novas interações e pontes de hidrogênio após o agente de ruptura das ligações intermoleculares ter sido removido (PLÁCIDO, 2007).

A queratina é uma macromolécula que tem sido bastante utilizada e estudada na formação de filmes com possível aplicação a embalagens biodegradáveis apresentando bons resultados nas propriedades dos filmes (REDDY et al., 2011; REDDY; CHEN; YANG, 2013; WANG; CAO, 2012), assim como as proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas de peixe (CENTENARO; MELLADO, 2008; CORTEZ-VEGA et al., 2013)

Filmes produzidos com zeína e glúten de trigo apresentam caráter hidrofóbico com boa barreira ao transporte de oxigênio, dióxido de carbono e demais compostos voláteis (WANG; RHIM, 2015). Entretanto, de acordo com Dick (2014), filmes individuais de proteínas apresentam-se extremamente frágeis devido às propriedades mecânicas não serem adequadas. A utilização de diferentes plastificantes, a fim de aumentar a flexibilidade desses filmes vem sendo estudado (FORATO et al., 2013; LIANG et al., 2015). Usualmente, o glicerol é o plastificante mais utilizado com o objetivo de reduzir a fragilidade destes (AHMED et al., 2012). Outras estratégias como a laminação (CHO; LEE; RHEE, 2010) e as blendas poliméricas também estão sendo utilizadas com estratégias para aumentar as propriedades de filmes biodegradáveis (DICK, 2014).

Assim, diversas são as pesquisas envolvendo a utilização desses biopolímeros no desenvolvimento de filmes biodegradáveis para possível aplicação a embalagens de alimentos (YONG et al., 2015; NIE et al., 2015; POOLE; CHURCH, 2015; RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016).

2.8 BLENDA POLIMÉRICAS

As blendas poliméricas podem ser constituídas pela mistura de diferentes polímeros sem que haja elevado grau de reação química entre os componentes. A interação molecular entre as cadeias dos polímeros é predominantemente do tipo secundária (intermolecular) (UTRACKI, 1989). Além de melhorar as propriedades físicas, químicas e mecânicas, a

elaboração de blendas a partir de polímeros biodegradáveis tem a finalidade de aumentar a taxa de biodegradação e reduzir o custo total do material (ISHIAKU et al., 2002).

A miscibilidade é uma característica importante para filmes, e está relacionada com a capacidade dos componentes utilizados se misturarem em nível molecular resultando em uma mistura homogênea (MOTHE; AZEVEDO, 2002). Do ponto de vista tecnológico, as blendas são classificadas em compatíveis ou incompatíveis. As blendas são compatíveis quando as propriedades finais apresentam um comportamento aditivo ou sinérgico em relação às propriedades apresentadas pelos componentes individuais. Em um sistema incompatível as propriedades são inferiores as apresentadas pelos componentes em separado (JACOB, 2006).

Os polímeros biodegradáveis também podem ser desenvolvidos misturando diferentes macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas. A combinação de proteínas é promissora no desenvolvimento de filmes biodegradáveis aproveitando as vantagens de cada um dos polímeros utilizados (SUN; SUN; XIONG, 2013). A mistura de matérias-primas altera as estruturas físicas e químicas de cada polímero devido a compatibilidade/incompatibilidade entre as macromoléculas utilizadas. A compatibilidade depende da estrutura química, peso molecular e conformação, conseqüentemente afetando as propriedades finais do polímero (CHINMA; ARIAHU; ABU, 2012).

Em geral, blendas combinando biopolímeros têm apresentado resultados promissores nas propriedades mecânicas e de barreira. Zuo, Song e Zheng (2009) observaram que a utilização de glúten de trigo foi responsável por melhorar as propriedades de barreira, enquanto que a metilcelulose provocou uma melhoria nas propriedades mecânicas. Chinma, Ariahu e Abu (2012) verificaram uma melhoria nas características de filmes biodegradáveis ao combinar amido de mandioca e concentrado proteico de soja, obtendo as melhores propriedades mecânicas e menor permeabilidade ao vapor d'água na proporção 50/50. Guerrero et al. (2013) relataram que a utilização de ágar com isolado proteico de soja formaram matrizes compactas e que reforçaram a rede tridimensional. Sun, Sun e Xiong (2013) também obtiveram propriedades melhores nas blendas de amido de ervilha e proteína de amendoim quando comparado ao biopolímeros separadamente. Estes autores observaram que ao incorporar 50 % de proteínas os filmes ficaram consideravelmente mais flexíveis e houve pouca diminuição na resistência à tração. Além disso, a adição de proteínas também provocou melhoria nas propriedades de barreira à água.

2.9 FILMES BICAMADAS

O desempenho obtido pelos filmes obtidos a partir de biopolímeros ainda é menor quando comparados aos polímeros sintéticos (GONZÁLEZ; IGARZABAL, 2013), deste modo, diversos estudos têm sido realizados com enfoque na melhoria das características gerais e, principalmente, das propriedades de barreira destes biopolímeros, através da sua laminação (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2009).

Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de melhorar as propriedades dos filmes à base de proteínas através da laminação de camadas de filmes adicionais com propriedades de película requeridas (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2008). De acordo com Fabra et al. (2013), o desenvolvimento de filmes bicamadas é uma prática comumente utilizada para aplicações em embalagens de alimentos que combinam as propriedades de dois ou mais materiais em uma única estrutura bicamadas. O autor salienta que a razão para este amplo uso é que um conjunto de múltiplas camadas, que segue um modelo de combinação de materiais perpendiculares à direção de transporte do permeante, é a forma mais eficiente para se obter um desempenho máximo de barreira.

Diversos autores têm estudado a elaboração destes filmes bicamadas obtendo resultados bastante satisfatórios e promissores. González e Igazarbal (2013) elaboraram filmes bicamadas de proteína isolada de soja (SPI) e poli (ácido lático) (PLA) e obtiveram melhoramentos nas propriedades dos filmes bicamadas quando comparados com os filmes preparados individualmente. O mesmo foi observado por Cho, Lee e Rhee (2010) ao elaborar um filme bicamada de zeína de milho e proteína isolada de soja e, por Arancibia et al. (2014) que estudaram a liberação de óleo essencial de canela como compostos antioxidantes e antibacterianos em camarões, utilizando como veículo um filme bicamada elaborado a partir de ágar e alginato. Kurek, Galus e Debeaufort (2014) estudaram as propriedades de filmes bicamada compostos por quitosana e proteína soro de leite. Outros autores também vem estudando as propriedades de bicamadas biodegradáveis a partir de diferentes polímeros biodegradáveis (GHANBARZADEH; OROMIEHI 2008; 2009; YOUNG et al., 2015; PIZZOLI, 2014; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2009; TÜRE et al., 2013).

2.10 ELABORAÇÃO DE FILMES

A formulação de filmes envolve, além da matriz principal (proteína, polissacarídeo, dentre outros polímeros), o uso de solventes e plastificantes, como glicerol e o sorbitol, que

estão entre os mais utilizados com o objetivo de aumentar a flexibilidade da rede polimérica. Os filmes são formados por forças coesivas entre as moléculas de polímeros, ou reticulação intramolecular das cadeias do polímero para formar uma matriz parcialmente rígida, que permite imobilizar parte do solvente.

O método de *casting* está entre os mais utilizados para a obtenção de filmes biodegradáveis, principalmente em escala laboratorial. Este método se baseia na fundição dos componentes em uma solução, com posterior moldagem em superfícies planas e inertes, seguida de secagem sob condições controladas para remoção do solvente e formação da película (MELLINAS et al., 2016; MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000).

2.11 PROPRIEDADES DOS FILMES

Definida como a distância perpendicular entre duas superfícies principais do filme, a espessura é um importante parâmetro de medida, pois é a base para várias propriedades dos filmes, incluindo as mecânicas e as de permeabilidade ao vapor de água. O controle da espessura dos filmes é importante para manter sua uniformidade, permitindo a repetibilidade das propriedades analisadas e assim validar as comparações entre suas propriedades (XIE et al., 2002).

A solubilidade em água define a tolerância do material a água e é determinada pela sua estrutura química. As embalagens obtidas a partir de filmes biodegradáveis devem manter os níveis de umidade no produto embalado, e o material da embalagem não deve ligar-se ou dissolver-se quando em contato com a umidade. Portanto, o conhecimento da solubilidade do material em água é importante para muitas aplicações, pois visa fornecer informações sobre a integridade da amostra após sua imersão em água, a temperatura e tempo específicos, visto que algumas aplicações requerem insolubilidade em água para manter a integridade do produto (PLÁCIDO, 2007).

Dentre as propriedades de barreira, a mais discutida na bibliografia é a permeabilidade ao vapor de água. O “*Annual Book of Standards*” (ASTM E96-00) define permeabilidade ao vapor de água (PVA) como a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área de um material delgado, de espessura conhecida, induzida por uma diferença de pressão entre duas superfícies específicas, sob condições de temperatura e umidade relativa específicas (ASTM, 2000).

O conhecimento da permeabilidade ao vapor de água é imprescindível para se definir as possíveis aplicações dos filmes em embalagens. Os filmes de proteína, em geral, são

relativamente permeáveis a vapor d'água e muitos estudos estão sendo realizados a fim de melhorar essa propriedade (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

A cor e a opacidade destacam-se dentre as propriedades óticas de filmes para aplicação em embalagens, porém estas não devem ser utilizadas como fator limitante de uso. Para uma boa apresentação visual do produto, é desejável que as embalagens apresentem elevado brilho e alta transparência. Entretanto, muitas vezes a proteção contra a incidência de luz se faz necessária (transparência baixa ou nula), como no acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz. O grau de transparência do filme dependerá de sua espessura e da estrutura do polímero utilizado, se mais amorfo, o filme será mais transparente, se mais cristalino, o filme será mais opaco (DICK, 2014).

As propriedades mecânicas de tração são úteis para a identificação e caracterização de filmes, pois expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento quando submetido à tração. Para manter a integridade e a propriedade de barreira, os filmes devem ser hábeis em resistir ao estresse normal encontrado durante sua aplicação. Normalmente, uma alta resistência é requerida, mas os valores de deformação devem ser ajustados de acordo com a aplicabilidade. A resistência máxima à tração é a resistência oferecida pelo material no ponto da ruptura. O alongamento é a relação percentual entre o alongamento do corpo-de-prova no teste e seu comprimento inicial (PIYADA; WARANYOU; THAWIEN, 2013).

A fim de prever o desempenho dos filmes à base de proteínas sob diferentes condições de uso final, as transições térmicas dos filmes devem ser investigadas. Dentre as técnicas mais importantes na análise térmica estão a análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) (AHMED, 2012).

A análise termogravimétrica (TGA) baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. Este é um processo contínuo que mede a variação de massa (perda ou ganho) de uma substância ou material como uma função da temperatura e/ou tempo (PLÁCIDO, 2007).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que mede temperatura e taxa de calor associados a transições em materiais como uma função do tempo e da temperatura em uma atmosfera controlada. Em amostras de polímeros, a técnica é empregada na medição de temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão (T_m) e cristalização (PLÁCIDO, 2007).

As características microestruturais dos filmes à base de proteínas são dependentes das formulações e condições de processamento utilizadas na sua elaboração (HERNANDEZ-

IZQUIERDO; KROCHTA, 2008). Essas propriedades podem ser analisadas por diferentes técnicas, dentre estas a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios x (DRX).

Informações estruturais do filme como a homogeneidade ou a presença de rupturas e falhas, é verificada através do MEV. A presença de rupturas e falhas pode afetar significativamente as propriedades mecânicas de um material (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

A técnica de DRX permite realizar estudos morfológicos em materiais, determinando o percentual de cristalinidade. Através desta técnica, pode-se avaliar os grupos funcionais dos filmes, bem como determinar possíveis interações entre os polímeros quando forem utilizados mais de um (RODRIGUES, 2012).

2.12 BIODEGRADABILIDADE

Dentro de uma estrutura de desenvolvimento sustentável, novos materiais estão sendo originados de maneira a aumentar suas propriedades de biodegradabilidade. Considera-se que a biodegradação ocorra ao longo de três fases: biodeterioração, biofragmentação e assimilação, sem desconsiderar a participação de fatores abióticos (LUCAS et al., 2008).

A ação combinada de comunidades microbianas, outros organismos decompositores e/ou fatores abióticos fragmentam os materiais biodegradáveis em frações minúsculas. Esta fase é chamada de biodeterioração (EGGINS; OXLEY, 2001; WALSH, 2001). A deterioração é uma degradação superficial que modifica as propriedades mecânicas, físicas e químicas de um determinado material (LUCAS et al., 2008).

A fragmentação é um fenômeno de lise necessária para a fase seguinte chamada assimilação. Um polímero é uma molécula com massa molar elevada, que não consegue atravessar a parede celular dos micro-organismos. Torna-se indispensável a quebra de várias ligações para se obter uma mistura de oligômeros e/ou monômeros, originando moléculas de baixa massa molar, devido à ação enzimática, ocasionando a fragmentação. A energia para realizar esta cisão é basicamente biológica. A assimilação ocorre no citoplasma, onde as moléculas transportadas integram o metabolismo microbiano para a produção de energia, biomassa, vesículas de armazenamento e numerosos metabólitos primários e secundários. Este último passo é denominado assimilação (LUCAS et al., 2008).

A biodegradação de um determinado material ocorre quando este é usado como nutriente por um determinado conjunto de micro-organismos (bactérias, fungos ou algas) do meio ambiente onde o material será degradado (AL-SAIDI; MORTENSEN; ALMDAL, 2003;

DE PAOLI, 2009). Para que as colônias cresçam se utilizando do material como nutriente, será necessário que estas produzam as enzimas próprias para quebrar ligações químicas da cadeia principal do polímero. Além disso, há necessidade de condições adequadas, como temperatura, pH, umidade e disponibilidade de oxigênio (DE PAOLI, 2009). De acordo com a American Society for Testing and Materials (ASTM), um plástico biodegradável é um plástico que se degrada devido à ação de micro-organismos que ocorrem naturalmente, tais como bactérias, fungos e algas. Existe uma diferença entre um plástico biodegradável e um plástico compostável. Um plástico compostável é um plástico submetido à degradação por processos biológicos durante a compostagem para produzir dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos e biomassa a uma taxa consistente com outros materiais compostáveis conhecidos e não deixa nenhum resíduo visualmente distinguível ou tóxico. Portanto, todos os plásticos compostáveis são biodegradáveis, mas o inverso não é verdadeiro (KALE et al., 2007).

A biodegradação de plásticos depende tanto do ambiente no qual estes estão inseridos como da natureza química do polímero. A biodegradação é uma reação enzimática, portanto, é muito específica para ligações e estruturas químicas dos polímeros. Existem diferentes mecanismos de biodegradação do polímero, sendo a hidrólise um dos mecanismos mais comuns, em que a cisão não-enzimática aleatória de grupos éster das cadeias leva a uma redução na massa molar. O processo de hidrólise é afetado pela taxa de difusão de água através do polímero. A biodegradação de plásticos depende de fatores ambientais e da estrutura química do polímero (DALEV et al., 2000; MARAN et al., 2014).

Os polímeros biodegradáveis contêm usualmente éster, amida, ou ligações de carbonato hidrolisáveis na cadeia principal do polímero. A presença destes grupos funcionais hidrolisáveis aumenta a susceptibilidade à biodegradação. Outros fatores que afetam a biodegradabilidade são a cristalinidade, a massa molar, e, no caso dos copolímeros, a sua composição (DOMB; KOST; WISEMAN, 1997).

CAPÍTULO III

APRESENTAÇÃO

As atividades experimentais da dissertação foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), e na Planta de Processamento de Pescados da Escola de Química e Alimentos (EQA) e no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Desta forma, o presente estudo foi dividido em dois artigos científicos:

- ARTIGO I: Efeito da utilização de diferentes matérias-primas proteicas no desenvolvimento de filmes e blendas biodegradáveis;
- ARTIGO II: Filmes bicamadas biodegradáveis elaborados a partir de proteínas de glúten de trigo, zeína de milho e isolado proteico de pescada.

ARTIGO I

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS PROTEICAS NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES E BLENDAIS BIODEGRADÁVEIS

RESUMO

A utilização de blendas e filmes biodegradáveis no desenvolvimento de embalagens visa reduzir os impactos ambientais causados pelas embalagens plásticas. Objetivou-se com o presente estudo desenvolver e caracterizar filmes a partir de diferentes matérias-primas proteicas utilizadas individualmente e em blendas. Para o desenvolvimento do estudo as proteínas de pescada (*Cynoscion guatacupa*) foram obtidas pelo processo de variação de pH, também foram utilizadas as proteínas, glúten e zeína. Os filmes de proteínas de pescada apresentaram a maior resistência à tração e maior solubilidade em água, enquanto que os filmes de glúten apresentaram maior alongamento na ruptura e solubilidade mais baixa, mostrando serem promissores no desenvolvimento de materiais de embalagem para diferentes aplicações. As blendas apresentaram propriedades ligeiramente melhores em relação aos filmes produzidos com os componentes utilizados em separado, sendo que a blenda produzida com proteínas de pescada e glúten (BL P+G) mostrou ser mais adequada para aplicações em alimentos devido as propriedades apresentadas. Os filmes de zeína apresentaram propriedades mecânicas deficientes e alta solubilidade e não foram completamente degradados em 60 dias em solo, sendo que os demais apresentaram completa biodegradação em até 30 dias. A avaliação da microestrutura apresentou filmes com aspecto rugoso e superfície não homogênea, além disso, os filmes contendo zeína apresentaram-se com mais zonas cristalinas quando comparados aos demais. A BL P+G demonstrou ser mais resistente a temperaturas próximas de 100 °C. Dentre os filmes e blendas desenvolvidos a BL P+G demonstrou ser a mais promissora para o desenvolvimento de materiais sustentáveis de embalagens para alimentos.

Palavras-chave: Biodegradação. Embalagens de alimentos. Glúten de trigo. Proteínas. Proteínas de pescada. Zeína.

1 INTRODUÇÃO

A síntese de novos biomateriais com desempenho e propriedades otimizadas constitui uma área em constante expansão na tecnologia de embalagens de alimentos. Um avanço significativo nesta área tem ocorrido com a síntese de blendas poliméricas constituídas de polímeros naturais de diferentes origens (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2009; 2010; ROMANI, PRENTICE-HERNÁNDEZ, MARTINS, 2017). Esta classe de materiais tem despertado grande interesse de pesquisadores nas últimas décadas por se tratar de uma alternativa simples e prática para se obter novos materiais com características e propriedades melhoradas e adequadas para aplicação em embalagens.

A elaboração de blendas e filmes biodegradáveis que possam ser utilizados como embalagens tem visado a redução dos impactos ambientais causados pelo elevado acúmulo de embalagens plásticas derivadas de polímeros sintéticos não biodegradáveis. Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de substituir esses materiais sintéticos derivados do petróleo, tais como, poliolefinas, poliésteres e poliamidas, por outros que apresentem propriedades semelhantes a esses polímeros e que após o seu descarte seja degradado em um curto período, não sendo acumulado no meio ambiente. Segundo a American Standard for Testing and Methods D20-96, polímeros biodegradáveis são polímeros, nos quais a degradação resulta primariamente da ação de micro-organismos, tais como, bactérias, fungos e algas de ocorrência natural (ASTM, 1999).

As blendas e os filmes biodegradáveis podem ser produzidos a partir de macromoléculas como polissacarídeos, proteínas e lipídios, sendo capazes de formar matrizes contínuas e coesas. As proteínas se destacam dentre esses materiais devido ao seu elevado potencial de formar ligações intermoleculares, essenciais para formação dos filmes. A capacidade de formação de filmes à base de proteínas pode ser influenciada pela composição de aminoácidos, assim como sua distribuição e polaridade que determinam as ligações cruzadas entre aminoácidos, hidrogênio e ligações dissulfeto (GENNADIOS et al., 1993). Proteínas musculares de pescada, glúten de trigo e zeína de milho apresentam-se como materiais promissores para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis devido a fácil obtenção, baixo custo e biodegradabilidade, além de agregar valor a essas matérias primas.

Subprodutos e resíduos da industrialização de pescados são ótimas fontes de proteínas, entre os quais destaca-se a pescada (*Cynoscion guatacupa*) comercializada atualmente na forma de filé originando um subproduto (aparas) com elevado teor proteico. As proteínas musculares de pescado apresentam propriedades vantajosas na elaboração de filmes,

como habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, além de apresentar boa barreira ao oxigênio, podem ocorrer uma ampla gama de interações intermoleculares formando filmes coesos (ARFAT et al., 2017; ROMANI; PRENTICE-HERNÁNDEZ; MARTINS, 2017; ROCHA et al., 2013). Entretanto, possui baixa barreira ao vapor de água em razão da sua natureza hidrofílica.

O glúten de trigo é um subproduto da produção de amido de trigo e etanol que é disponibilizado a um custo relativamente baixo. Devido às suas propriedades coesivas e elásticas únicas, apresenta-se como uma alternativa para a formação de filmes transparentes, flexíveis e inodoros com boas propriedades de alongamento na ruptura (HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012).

Assim como o glúten de trigo, a zeína de milho é uma proteína de reserva com crescente interesse no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (OZCALIK; TIHMINLIOGLU, 2013). A zeína possui caráter hidrofóbico, devido à elevada concentração de aminoácidos não polares, como leucina, alanina e prolina, que a torna insolúvel em água mesmo em baixa concentração e solúvel em soluções alcoólicas de 60-95% de etanol (TAVARES, 2012). Com a zeína pode-se produzir filmes com excelentes propriedades de barreira à umidade e formando cobertura insípida, dura e transparente com grande estabilidade em alta umidade e calor (PAPALIA; LONDERO, 2015; SANCHEZ-GARCIA; HILLIOU; LAGARON; 2010; TIHMINLIOGLU; ATIK; ÖZEN; 2011;). No entanto, os filmes a base de zeína são frágeis, necessitando, adição de plastificantes e outros componentes como glicerol, de forma que o material tenha flexibilidade e resistência desejável (RIBEIRO; LOPES-FILHO; CORTES, 2015).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação da biodegradabilidade de filmes e blendas poliméricas constituídas por diferentes tipos de proteínas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados a zeína de milho (Sigma Aldrich®) com teor proteico de 88% (m/v), o glúten de trigo (Foco Alternativo®) com teor proteico de 72% (m/v), azeite de oliva e emulsificante Emustab® foram adquiridos no comércio local e armazenadas ao abrigo da luz em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) até o momento do

uso. As aparas de pescada (*Cynoscion guatacupa*) foram gentilmente fornecidas pela empresa Torquato Pontes S/A (Rio Grande – Rio Grande do Sul) e acondicionadas a -18 °C até o momento do uso.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção das proteínas de pescada

Uma curva de solubilidade proteica das aparas de pescada foi realizada segundo método descrito por Tadpichayangkoon et al. (2010), visando obter maior rendimento na extração das proteínas, através da identificação de seus pontos de solubilidade e ponto isoelétrico.

Foram preparadas diluições (1%) da amostra em água destilada, e os pH 2; 3; 4; 5; 5,5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 11,5 e 12 foram ajustados com adição de NaOH 1 mol/L e/ou HCl 1 mol/L. Todas as diluições foram realizadas em triplicata. Após a etapa de solubilização, o teor de proteína solúvel na solução foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951) em espectrofotômetro (IONLAB, IL-592, Brasil) a 660 nm. A solubilidade (S%) da proteína foi calculada conforme a Equação 1. Para o cálculo de proteína no sobrenadante foi realizada uma curva padrão de albumina (0,00 a 0,42 mg/mL).

$$S (\%) = \frac{\text{Proteína do sobrenadante}}{\text{Proteína presente na amostra}} \times 100 \quad (1)$$

Para a obtenção do isolado proteico foram utilizadas aparas de pescada. A extração das proteínas ocorreu conforme método descrito por Freitas et al. (2011), diferindo apenas no pH de solubilização das proteínas.

A matéria-prima foi homogeneizada com água destilada na proporção 1:9 (m/v) e triturada em blender (METVISA, 1322, Brasil) por 1 min. Após, foi realizada a solubilização das proteínas com adição de NaOH 1 mol/L a 4 °C em banho ultratermostático (QUIMIS, 0214M2, Brasil) durante 20 min sob agitação constante com agitador de eixo-hélice (IKA, RW20DZM.n, Alemanha). As proteínas solubilizadas foram então centrifugadas a 9000 x g por 20 min a 4 °C para separá-las dos lipídios (fase superior) e das proteínas insolúveis (fase inferior). As proteínas solúveis (fase intermediária) foram colocadas novamente no banho sob as mesmas condições, e foram precipitadas ao atingir o ponto isoelétrico, com adição de HCl 1 mol/L. A seguir, foi realizada uma segunda centrifugação a 9000 x g por 20 min a 4 °C

e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi submetido à secagem a 40 °C em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil) por aproximadamente 12 h. Após seco, foi triturado em moinho de facas (TECNAL, TE-633, Brasil), peneirado (Mesh 42), e armazenado em embalagem de vidro a -18 °C para uso posterior.

2.2.2 Caracterização das matérias-primas e do isolado proteico

As matérias-primas e o isolado proteico de pescada foram avaliadas quanto a sua composição proximal através dos métodos oficiais da AOAC (2000), umidade em estufa a 105 °C (método 950.46), proteína bruta pelo método micro-Kjeldahl (fator de conversão 6,25) (método 928.08), lipídios totais em extrator de Soxhlet (método 960.39) e, para matéria mineral com incineração em mufla a 550 °C (método 920.153). Carboidratos foram determinados por diferença. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.3 Elaboração dos filmes individuais

Os filmes foram obtidos pelo método de *casting*, que se baseia na elaboração de uma solução coloidal das proteínas com os aditivos. As soluções filmogênicas foram homogeneizadas em banho termostático (BROOKFIELD, TC-102, Estados Unidos) acoplado a um reator encamisado de vidro e mantidas sob agitação com o auxílio de um agitador mecânico (FISATOM, 712, Brasil). Ao final da dissolução, a secagem de todos os filmes ocorreu em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil), após o espalhamento das soluções em placas de Petri com diâmetro de 8,7 cm. Posteriormente a secagem, todos os filmes foram armazenados em dessecadores com umidade relativa de 55 ± 2 % controlada com Brometo de Sódio (NaBr), e temperatura de 25 ± 2 °C, por no mínimo 48 h, para posteriores análises.

2.2.4 Elaboração dos filmes de isolado proteico de pescada

A elaboração dos filmes de proteínas de pescada, seguiu o método descrito por Zavareze et al. (2013). Inicialmente, o isolado proteico, na concentração de 5% (m/v) foi dissolvido em água destilada, e então, foi adicionado glicerol na proporção de 25% em relação a massa total de sólidos. Esta dispersão foi mantida sob agitação constante por 30 min a ± 25

°C. Após, o pH da solução foi ajustado para 11,5 com NaOH 1 mol/L mantendo-se a agitação por mais 10 min. Em seguida a temperatura foi elevada a 80 °C sob agitação por mais 20 min, mantendo-se o pH. Após, a solução foi filtrada em tecido de nylon, vertida em placas de Petri, e seca a 30 °C por 16 h em estufa com circulação de ar.

2.2.5 Elaboração dos filmes de glúten de trigo

A elaboração dos filmes de glúten de trigo seguiu o método descrito por Gontard, Guilbert e Cuq (1993), com adaptações. A formação da solução filmogênica (100 mL) ocorreu com a dispersão do glúten na concentração 8% (m/v) em 45 mL de etanol absoluto, com adição de glicerol na proporção de 25% (m/m) e 0,025 g de sulfito de sódio, ambos previamente dissolvidos em água destilada. A solução foi mantida sob agitação por 10 min à temperatura ambiente. Água destilada foi adicionada até completar o volume de 100 mL, e o pH 11 foi alcançado com a adição de NaOH 1 mol/L. Após, ocorreu a elevação da temperatura a 45 °C e a solução foi mantida sob agitação constante por 30 min. Terminado este período, a solução foi filtrada em tecido de nylon para remoção de partículas não solubilizadas e vertida em placas de Petri que foram secas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 24 h.

2.2.6 Elaboração dos filmes de zeína de milho

A elaboração dos filmes de zeína de milho seguiu o método descrito por Almeida (2010) com modificações. Zeína e etanol (95%) (20 g de zeína/100 mL de etanol) foram submetidos à agitação por 10 min. Após, adicionou-se azeite de oliva (70 g/100 g de proteína), glicerol (20 g/100 g de proteína) e emulsificante Emustab (5 g/100 de proteína). Elevou-se a temperatura até 65 °C e manteve-se a agitação por mais 15 min. Ao final do processo, a solução foi vertida em placas de Petri que foram submetidas à secagem a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 24 h.

2.2.7 Elaboração das blendas

As blendas foram elaboradas com as concentrações de proteínas que formaram filmes com melhores propriedades físicas e mecânicas. No desenvolvimento das blendas, primeiramente foram elaboradas as soluções filmogênicas individuais, conforme descrito no

item 2.2.3, então, foi misturado 50% de cada solução filmogênica. As blendas foram elaboradas com isolado proteico de pescada 5% (m/v) e glúten de trigo 8% (m/v), zeína 20% com glúten de trigo 8% (m/v), e zeína 20% com isolado proteico de pescada 5%.

2.2.8 Caracterização dos filmes

2.2.8.1 Espessura

A espessura (mm) dos filmes foi determinada utilizando micrômetro digital (INSIZE IP54, Brasil) em dez pontos diferentes, sendo um no centro e os demais na periferia dos filmes.

2.2.8.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi determinada segundo método proposto por Gontard et al. (1994). Os filmes foram cortados em discos de 2 cm de diâmetro e levados à estufa (DELEO, A15E, Brasil) a 105 °C para determinação da matéria seca inicial. Após, estes foram imersos em 50 mL de água destilada e mantidos sob agitação de 175 rpm a 25 °C por 24 h. Decorrido esse período as amostras foram removidas e secas a 105 °C para determinação da matéria seca que não se dissolveu. Para o cálculo da solubilidade S (%) foi utilizada a Equação 2. Onde m_i corresponde a massa seca inicial (g) e m_f corresponde a massa seca final (g).

$$S = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2)$$

2.2.8.3 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente segundo o método E96-00 da ASTM (ASTM, 2000), que consiste na pesagem de uma cápsula fechada, contendo o filme na superfície e a substância dessecante (cloreto de cálcio) no interior. A cápsula foi colocada em ambiente com umidade controlada, utilizando solução de cloreto de sódio para manter o ambiente externo a 75 % de umidade relativa. A célula de permeação contendo o filme foi pesada a cada 24 h por 7 dias. Para o

cálculo dos valores foi utilizada a Equação 3, em que M é o ganho de massa do CaCl_2 (g); E é a espessura do filme (mm); A é a área de permeação (m^2), t é o tempo (dias) e ΔP é o diferencial de pressão de vapor (kPa).

$$\text{PVA} = \frac{M.E}{A.t.\Delta P} \quad (3)$$

2.2.8.4 Propriedades óticas

A cor e a opacidade dos filmes foram determinadas utilizando-se um colorímetro (MINOLTA, CR 400, Japão), através do sistema CIEL*a*b. Os parâmetros analisados neste sistema de cores são: L (luminosidade), a* (verde e vermelho) e b* (azul e amarelo). A cor dos filmes foi expressa como diferença total de cor (ΔE^*), a qual é calculada conforme Equação 3.

$$\Delta E = \sqrt{(L^*-L)^2 + (a^*-a)^2 + (b^*-b)^2} \quad (4)$$

A opacidade dos filmes foi calculada com a relação entre a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto (Y_{preto}) e ao padrão branco (Y_{branco}), segundo a Equação 5.

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{Y_{\text{preto}}}{Y_{\text{branco}}} \times 100 \quad (5)$$

2.2.8.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas em texturômetro (*Stable Micro Systems*, TA.XTplus, Reino Unido), empregando-se a metodologia ASTM D882- 02 (ASTM, 2002). As propriedades determinadas foram resistência à tração (MPa) e alongamento na ruptura (%). A separação inicial e a velocidade do *probe* foram de 50 mm e 1 mm/s, respectivamente. As amostras foram cortadas em tiras de 85 mm de comprimento e 25 mm de largura. Para a determinação dos valores de resistência à tração (MPa) foi utilizada a Equação 6, em que F é a força no momento da ruptura do filme (N) e A a área da secção transversal do filme (m^2).

$$RT = \frac{F}{A} \quad (6)$$

O alongamento na ruptura (AR) foi calculado utilizando a Equação 7, em que df (mm) corresponde a distância final de alongamento do filme, e di (mm) é a distância inicial entre as garras (50 mm).

$$AR (\%) = \frac{df}{di} \times 100 \quad (7)$$

2.2.8.6 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos filmes foram determinadas pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), de acordo com Piyada, Waranyou e Thawien (2013). Para a realização do (DSC) cerca de 4 mg de amostra foram pesadas em cápsulas de alumínio que posteriormente foram hermeticamente seladas. A taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C/min, sendo utilizada uma faixa de temperatura de 30 a 200 °C.

A TGA dos filmes foi realizada utilizando-se uma termobalança de um medidor termoanalítico (SHIMADZU, modelo DTG-60, Japão) em atmosfera estática de ar, com vazão constante de 20 mL/min. A velocidade de varredura foi de 10 °C/min e a faixa de temperatura percorrida de 23 até 550 °C utilizando porta amostra de alumínio.

2.2.8.7 Propriedades microestruturais

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6610LV, Tóquio, Japão) operando a 10 kV. As amostras foram depositadas em suportes de alumínio (*stubs*), revestidos com uma fita condutora de carbono. Em seguida, os mesmos foram recobertos com uma fina camada de ouro em *Sputtering* (Desk, Deton Vacuum, Estados Unidos) durante 120 s. Observou-se a morfologia da superfície e a parte transversal dos filmes com uma ampliação de 1000 x.

A análise de difração de raios X (DRX) também foi realizada no CEME-SUL – FURG, utilizando-se um difratômetro (BRUKER, D8 Advance, Estados Unidos) com radiação

de cobre, operando a 40 kV e 40 mA. As medidas foram obtidas com comprimento de onda (λ) de 1,5418Å, incremento de 0,0025 e com intervalos de medida em 2Θ de 5 a 40°.

2.2.9 Biodegradabilidade dos filmes e blendas em solo

A avaliação da degradação dos filmes em solo foi realizada de acordo com método descrito por Maran et al., (2014) com modificações. Os filmes foram cortados em pedaços retangulares de 2x3 cm, obtendo-se um rendimento de 4 tiras de cada filme. Dessas 4 tiras, um foi utilizado para a determinação da umidade (método oficial AOAC, 2000) e os demais foram pesados em balança analítica (Marte, AY220, Minas Gerais, Brasil) para a determinação da massa inicial. Estes filmes foram acondicionados em cartuchos de tela e colocados a uma profundidade de aproximadamente 8 cm a partir da superfície do solo. O solo utilizado neste ensaio foi composto de 50% de substrato para plantas com umidade máxima de 40% e pH $6,0 \pm 0,5$, e 50% de terra adquirida nas proximidades do Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande – RS. Aproximadamente 5 kg de solo foi colocado em caixas de plástico (10x30x35cm) onde os cartuchos contendo os filmes foram enterrados. Essas caixas foram incubadas a $20 \pm 0,2$ °C por 60 dias e a umidade do solo foi mantida a ($29,1 \pm 3,2\%$) em ambiente com umidade relativa de $76,2 \pm 2,3\%$ com aspersão de água em intervalos regulares. De 10 em 10 dias amostras (em triplicata) foram retiradas aleatoriamente do solo, lavadas cuidadosamente em água corrente para remoção do solo e secas em estufa a 105 °C até peso constante (aproximadamente 6 h).

A massa de cada amostra foi obtida antes e depois da degradação, e a perda de massa (PM) de cada amostra de filme foi obtida utilizando-se a Equação 8:

$$PM (\%) = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (8)$$

Onde: M_0 é a massa do filme (em base seca) antes da biodegradação; M_1 é a massa do filme depois da biodegradação.

2.2.9.1 Caracterização do solo

A umidade do solo foi monitorada durante o experimento de 7 em 7 dias de acordo com a método da AOAC (2000). Além disso, foram realizadas análises microbiológicas de

contagem total de bactérias mesófilas e contagem total de fungos segundo métodos descritos por (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). A análise microbiológica foi realizada no tempo zero.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d'água, propriedades óticas e propriedades mecânicas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados foram avaliados pelo programa Statistic (versão 5.0, StatSoft, Inc., Tulsa, Estados Unidos).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS

Todas as matérias-primas apresentaram teor proteico relativamente alto (Tabela 1), o que é de extrema importância, visto que, as proteínas são as matrizes utilizadas para a elaboração dos filmes biodegradáveis.

Tabela 1 - Composição proximal de zeína de milho (ZM), glúten de trigo (GT), aparas de pescada (AP) e isolado proteico (IP)

	Umidade (%)	Cinzas (%)*	Lipídios (%)*	Proteínas (%)*	Carboidratos (%)**
ZM	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,0	3,2 ± 0,1	90,2 ± 0,0	5,1
GT	8,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	78,4 ± 0,4	20,1
AP	83,2 ± 0,1	5,7 ± 0,1	4,1 ± 0,1	90,8 ± 0,3	0,0
IP	5,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	91,3 ± 0,0	5,9

*Dados em base seca; **Carboidratos determinados por diferença; ± desvio padrão

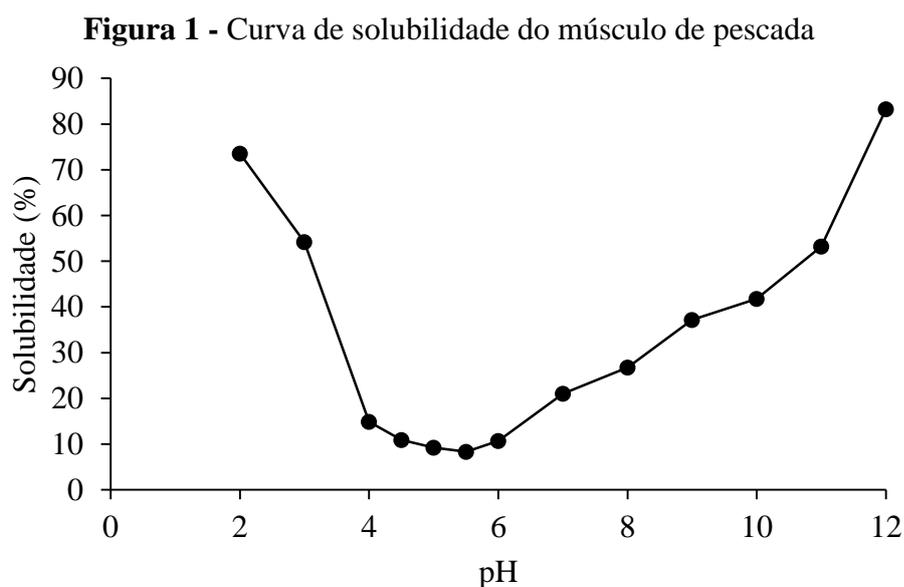
O elevado teor de lipídios encontrado na zeína pode promover características de menores permeabilidades aos filmes elaborados com essa proteína, pois, de acordo com Hernandez-Izquierdo e Krochta (2008), filmes elaborados a base de proteínas geralmente apresentam elevada permeabilidade de vapor d'água devido à natureza hidrofílica destas, e de acordo com Brandelero, Grossmann e Yamashita (2013), a resistência de um filme ao vapor d'água é inversamente proporcional a polaridade dos lipídios.

Pequenas variações na composição proximal podem ocorrer devido a fatores naturais para cada tipo de matéria-prima. Valores de composição de glúten de trigo e zeína podem variar em função da época e condições de plantio, cultivar e estação do ano. O processo de obtenção e purificação dessas proteínas também podem exercer forte variação em sua composição (FERREIRA; RUIZ; GASPAR-CUNHA, 2014). A composição da pescada pode variar conforme os tecidos e estação do ano entre outros fatores (YEANNES; ALMANDOS, 2003).

Com o processo de separação das proteínas das aparas de pescada houve aumento no teor de proteínas (91,3%) e a redução dos teores de lipídios (1,5%) e cinzas (1,3%). A redução do conteúdo lipídico ocorre devido a maior parte dos lipídios ser separada junto com a fração insolúvel durante o processo de concentração de proteínas.

3.2 SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS DE PESCADA

A curva de solubilidade (Figura 1), resultou na identificação do pH que promoveu a menor solubilidade (8,31%) das proteínas de pescada (pH 5,5). Este valor de pH se encontra próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, onde o número de cargas negativas e positivas tendem a se neutralizar intramolecularmente, apresentando menor afinidade pelo solvente. Segundo Sgarbieri (1996), o ponto isoelétrico das proteínas pode variar entre pH 4,0 e 6,0.



Um aumento progressivo da solubilidade do pH neutro para os pHs alcalinos foi verificado, sendo que os maiores valores de solubilidade foram obtidos no pH 12,0 (83,3%), pois, à medida que o pH se torna mais alcalino, há predominância de cargas negativas, havendo interação mais forte das moléculas de proteína com a água e, também, maior repulsão entre as moléculas de proteína, aumentando significativamente a solubilidade. No pH 2,0 a solubilidade também foi alta (73,5%).

Comportamento semelhante foi encontrado por Fontana et al. (2009). De acordo com os autores, é possível obter isolado proteico pelas duas vias (ácida e alcalina), entretanto, as propriedades funcionais do isolado (solubilidade e a capacidade de retenção de água) são melhores para aqueles promovidos pela via alcalina.

As informações obtidas através da curva de solubilidade são de grande importância, para que, durante o processo, se obtenha o maior rendimento de extração das proteínas. Com o pH de maior solubilidade é possível obter a máxima solubilização das proteínas presentes na amostra e, com o ponto isoelétrico exato, é possível recuperar as proteínas, obtendo um bom rendimento e evitando perdas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES E BLENDA

Para a elaboração dos filmes de zeína, foi necessária alta concentração proteica para a obtenção de uma matriz mais homogênea. TestesB preliminares foram realizados com o objetivo de reduzir a concentração de zeína na solução, e foi verificado que concentrações abaixo de 20% (m/v) não são suficientes para a elaboração de filmes homogêneos, apresentando-se quebradiços e com separação da proteína do solvente.

Não foi possível obter a blenda das proteínas de pescada com zeína em virtude de os materiais serem solúveis em diferentes solventes, levando a separação destes em solução.

3.3.1 Espessura e propriedades óticas

A espessura é uma propriedade importante que deve ser avaliada e considerada ao indicar a aplicação dos filmes como embalagem de alimentos, entretanto, trata-se de uma característica de difícil controle, principalmente em filmes elaborados pelo método de *casting* (DICK, 2014). Os filmes elaborados individualmente com proteínas de pescada e glúten de trigo não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Espessuras mais elevadas foram apresentadas pela blenda de zeína com glúten e pelo filme individual de zeína, 0,480 e 0,364 mm, respectivamente (Tabela 2). A maior espessura foi observada para a blenda de zeína com glúten, visto que a concentração final dessa solução foi a maior quando comparada aos demais filmes. Como já era esperado, quanto maior a concentração proteica dos filmes e blendas, maior foi a espessura apresentada por estes. De acordo com Dick (2014), a espessura do filme influencia nas propriedades mecânicas, de barreira e também na cor do filme. Quanto maior a espessura, mais opaco e escuro o filme será. Os valores encontrados para opacidade e diferença total de cor do filme de zeína e da blenda de zeína com glúten confirmam essa afirmativa. Além disso, os filmes de pescada, glúten e a bicamada de pescada com glúten, que apresentaram espessura menor, também tiveram seus valores de opacidade e diferença total de cor reduzidos.

Tabela 2 - Espessura, opacidade e diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes individuais e blendas

Amostras	Espessura (mm)	Opacidade (%)	ΔE^*
FP	0,113 \pm 0,001 ^d	11,0 \pm 0,6 ^d	15,3 \pm 0,3 ^d
FG	0,121 \pm 0,002 ^d	13,4 \pm 0,3 ^c	16,8 \pm 1,0 ^{cd}
FZ	0,364 \pm 0,002 ^b	36,4 \pm 1,0 ^a	73,8 \pm 1,6 ^a
BL Z+G	0,480 \pm 0,010 ^a	23,0 \pm 0,2 ^b	69,7 \pm 0,6 ^b
BL P+G	0,148 \pm 0,001 ^c	13,8 \pm 0,3 ^c	19,9 \pm 1,6 ^c

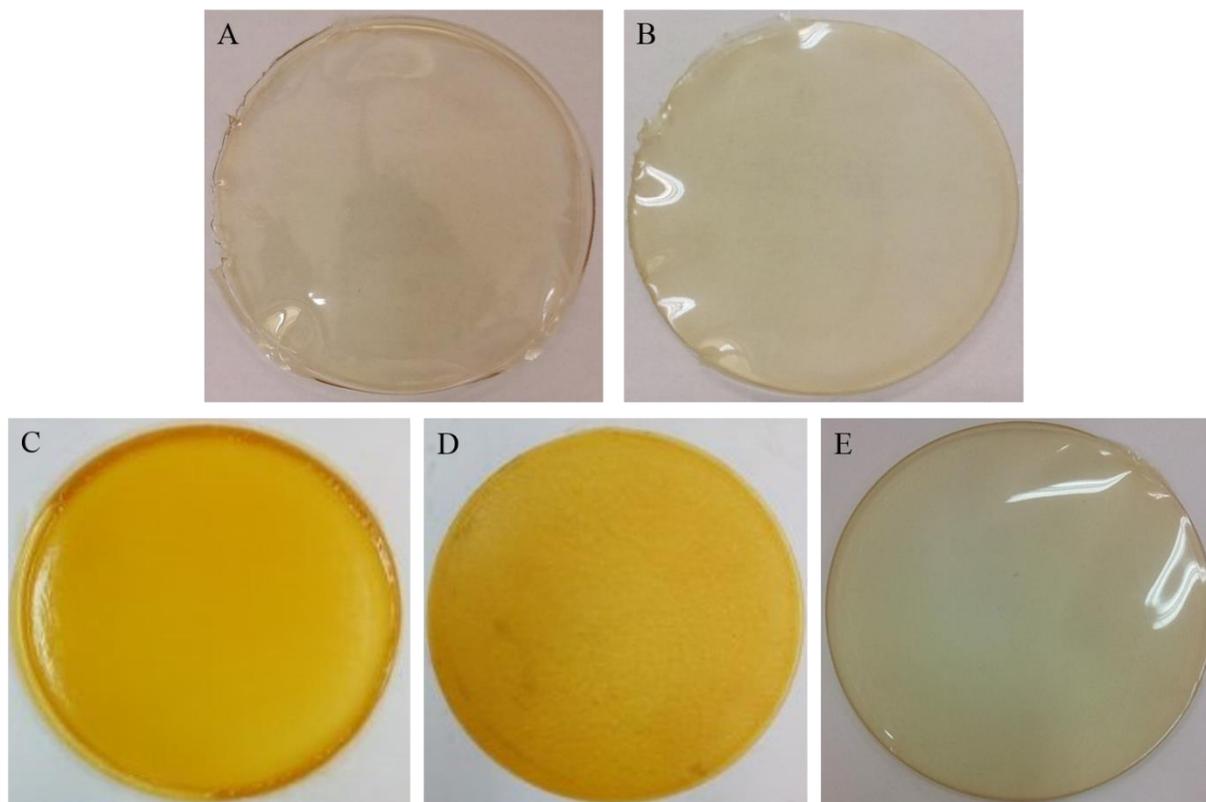
FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BL Z+G: blenda de zeína e glúten; BL P+G: blenda de isolado proteico de pescada e glúten de trigo; ΔE^* : diferença total de cor Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A opacidade e cor dos filmes para aplicação em embalagens são características importantes, mas não devem ser utilizadas como fator limitante de uso. Os parâmetros de cor dos filmes de embalagens biodegradáveis são importantes em termos de aparência e aceitabilidade do consumidor (ROMANI; PRENTICE-HERNÁNDEZ; MARTINS, 2017). Para boa apresentação do produto é desejável que as embalagens apresentem elevado brilho e transparência, entretanto, quando é realizado o acondicionamento de produtos sensíveis a reações de deterioração catalisadas pela luz, a proteção contra a incidência de luz se faz necessária (baixa ou nula transparência) (DICK, 2014; SAKANAKA, 2007).

A cor amarela do filme de zeína ($\Delta E^*=73,8$) e da blenda de zeína com glúten ($\Delta E^*=69,7$) é atribuída à presença de carotenoides do milho que ficam agregados à zeína, esses carotenoides possuem cor intensa variando do amarelo ao vermelho (RIBEIRO, 2015) o que

levou as diferenças óticas apresentadas por estes, indicando filmes mais escuros quando comparados aos filmes e blenda elaborados com glúten de trigo e proteínas de pescada.

Figura 2 - Filmes e blendas poliméricas de proteínas musculares de pescada, glúten de trigo e zeína de milho



A: filme de isolado proteico de pescada; B: filme de glúten de trigo; C: filme de zeína de milho; D: blenda de zeína e glúten de trigo; E: blenda de isolado proteico de pescada e glúten de trigo.

Chinma, Ariahu e Abu (2012) e, Sun, Sun e Xiong (2013), sugerem que o aumento da coloração pode ser devido aos produtos intermediários ou finais da reação de Maillard conforme demonstrado na Tabela 2 e Figura 2.

3.3.2 Propriedades mecânicas, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água

As propriedades mecânicas são de extrema importância na caracterização de filmes, pois expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento quando submetido à tração. Para manter a integridade e as propriedades de barreira, os filmes devem resistir ao estresse normal encontrado durante sua aplicação e serem flexíveis o suficiente para adaptar-se a eventuais deformações dos alimentos (VICENTINI, 2003; WIHODO; MORARU, 2013). A Tabela 3 apresenta os resultados das propriedades dos filmes individuais e das blendas.

A resistência a tração dos filmes e blendas elaborados foi semelhante, destacando-se o filme elaborado com proteínas de pescada, seguido da blenda de pescada com glúten, os quais apresentaram os maiores valores (3,2 e 3,1 MPa respectivamente), não diferindo significativamente entre si ($p > 0,05$). Os demais filmes apresentaram valores entre 2,4 e 2,8 MPa. O alongamento na ruptura dos filmes elaborados com glúten de trigo foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparados aos demais filmes e blendas. O glúten de trigo é formado pelas gliadinas, que é caracterizada pela alta extensibilidade e baixa elasticidade, e pela glutenina, que apresenta baixa extensibilidade e alta elasticidade. A gliadina apresenta ligações apenas intramoleculares, o que resulta na sua baixa elasticidade, enquanto as gluteninas, além das ligações intramoleculares, apresentam também ligações intermoleculares que justificam sua alta elasticidade (AQUINO; 2012), assim, a glutenina se torna a principal responsável pelo alto alongamento na ruptura apresentada pelos filmes de glúten de trigo e por melhorar a propriedade do filme de pescada ao formar a blenda com glúten.

Tabela 3 - Resistência a tração (RT), alongamento na ruptura (AR), solubilidade em água (SOL) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes individuais e das blendas

Amostras	RT (MPa)	AR (%)	SOL (%)	PVA
				(g.mm/m ² .dia.KPa)
FP	3,2 ± 0,3 ^a	116,1 ± 1,0 ^c	43,4 ± 0,7 ^a	6,8 ± 0,1 ^d
FG	2,5 ± 0,1 ^c	204,1 ± 2,6 ^a	22,0 ± 0,7 ^c	8,7 ± 0,6 ^{cd}
FZ	2,4 ± 0,2 ^c	0,5 ± 0,0 ^e	31,1 ± 2,9 ^b	13,4 ± 1,2 ^b
BL Z+G	2,8 ± 0,1 ^{bc}	11,1 ± 0,4 ^d	16,1 ± 1,7 ^d	16,1 ± 1,3 ^a
BL P+G	3,1 ± 0,1 ^{ab}	156,3 ± 2,6 ^b	30,5 ± 1,5 ^b	10,4 ± 1,0 ^c

FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BL Z+G: blenda de zeína e glúten; BL P+G: blenda de isolado proteico de pescada e glúten de trigo; Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A blenda elaborada com proteínas musculares de pescada e com glúten de trigo apresentou o segundo maior valor de alongamento na ruptura, seguida do filme de pescada (153,3% e 116,1%, respectivamente). De acordo com Dangaran e Tomasula (2009), através do isolamento das proteínas pelo processo de variação de pH, conforme realizado no presente trabalho, são obtidas as proteínas miofibrilares, as quais são constituídas principalmente por actina e miosina, responsáveis pelas propriedades funcionais das proteínas, onde está incluída a capacidade de formação de filmes flexíveis, o que influencia nas propriedades mecânicas dos filmes elaborados a partir dessas macromoléculas.

A maior resistência à tração do filme de proteínas de pescada (3,2 MPa) e da blenda constituída por glúten e proteínas de pescada (3,1 MPa) ocorre devido a presença de ligações covalentes fortes, especialmente ligações dissulfeto (ROCHA et al, 2013). É importante ressaltar que ao desenvolver filmes de blendas de diferentes proteínas em geral são obtidas propriedades intermediárias em relação aos filmes elaborados com as matérias-primas em separado devido à combinação das características dos diferentes materiais utilizados, conforme explicado por Wu et al. (2002). Este comportamento pode ser observado ao comparar os filmes de glúten e das proteínas de pescada com a blenda P+G, onde se obteve valores de resistência a tração e alongamento na ruptura intermediários (RT de 3,1 MPa e AR de 156,3%).

O filme de zeína apresentou o menor valor de alongamento, 0,5%, seguido da blenda de zeína com glúten de trigo (11,1%). A fraca interação entre as proteínas e os demais constituintes da solução filmogênica do filme de zeína são as possíveis causas desse baixo alongamento. Ao serem retiradas das placas, as matrizes de zeína apresentaram-se quebradiças e com aspecto oleoso, indicando a migração do azeite de oliva para a superfície. Com a elaboração da blenda de zeína com glúten, somente o alongamento na ruptura desta aumentou, indicando que ocorreu melhora desta propriedade advinda do filme de glúten. Como a resistência à tração dos filmes individuais (FZ e FG) apresentou-se baixa, sem diferença significativa, essa característica não foi melhorada com a elaboração da blenda.

As propriedades de alongamento na ruptura e permeabilidade ao vapor d'água são diretamente influenciadas pela espessura do filme. Quanto maior a espessura do filme, maior será a PVA apresentada por este, e menor será o seu alongamento na ruptura (DICK, 2014). O FZ e a BL Z+G apresentaram as maiores espessuras quando comparados aos demais, e isso pode ter afetado as suas características de AR, que foi menor e, PVA, que foi maior quando comparado com os demais filmes.

A solubilidade em água é uma importante propriedade dos filmes no que se refere a embalagens, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água para proteger a integridade do produto, enquanto outras necessitam alta solubilidade como é o caso de revestimentos de produtos que serão cozidos juntamente com seus envoltórios e encapsulação de alimento ou de aditivo (RIBEIRO, 2014). Os filmes elaborados a partir de isolado proteico de pescada apresentaram os maiores valores de solubilidade em água. A elevada solubilidade dos filmes provenientes de proteínas de pescada ocorre devido à alta hidrofiliabilidade apresentada por essas proteínas, uma vez que possuem componentes altamente polares com alto nível de ligações de hidrogênio e grupamentos hidroxila (KOKOSZKA et al. 2010). Estes mesmos filmes apresentaram menor permeabilidade ao vapor d'água (PVA). Acredita-se que formação

de uma matriz mais densa com maior interação entre as proteínas ao final da secagem resultou em filmes com poucos ou pequenos espaços livres, dificultando a passagem do vapor de água através do filme.

De acordo com Ribeiro (2014), a zeína é uma proteína de caráter hidrofóbico e produz filmes com excelentes propriedades de barreira a umidade, entretanto, o contrário foi observado neste estudo. Os filmes elaborados com zeína apresentaram elevada solubilidade em água assim como elevada PVA. A fragilidade e porosidade apresentada pelos filmes de zeína permitiram a passagem do vapor de água assim como a sua interação com as moléculas de água promovendo baixas propriedades de barreira e solubilidade elevada. Ribeiro (2014) também relata que filmes a base de zeína são frágeis, necessitando, adição de plastificantes e outros componentes como glicerol, de forma que o material tenha flexibilidade e resistência desejável. Entretanto, a fraca interação da proteína com os compostos adicionados, ou a polaridade desses pode afetar negativamente as propriedades de barreira desses filmes.

Possivelmente a interação do glúten de trigo com a zeína na elaboração da blenda tenha sido a responsável pela queda de solubilidade apresentada por essa blenda, pois as duas proteínas possuem aminoácidos hidrofóbicos em sua estrutura. Com maior ligação entre as proteínas, a interação com as moléculas de água foi de menor ordem quando comparado ao filme individual de zeína acarretando na queda de solubilidade, entretanto, esse decréscimo não foi refletido na PVA da blenda de zeína com glúten que apresentou maior valor de PVA quando comparada aos demais filmes (16,1 g.mm/m²dia.KPa). A heterogeneidade superficial apresentada pela blenda indica a formação de espaços livres na matriz, permitindo a passagem do vapor de água.

Segundo Brandelero, Grossmann e Yamashita (2013) e Cortes (2015), a barreira ao vapor de água assim como a solubilidade em água pode estar relacionada com a razão entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas do filme e com as características das substâncias adicionadas, como polaridade, presença de ramificações. Com isto, pode-se notar um aumento da PVA das blendas quando comparadas às matrizes individuais de mesmo polímero.

Filmes individuais de glúten de trigo apresentaram valores intermediários de PVA e solubilidade, entretanto, com a adição da proteína de pescada para formação da blenda ocorreu aumento na solubilidade, de 20,0% para 30,5%. Acredita-se que a polaridade das proteínas de pescada tenha influenciado nesses valores.

3.3.3 Propriedades térmicas

Os polímeros apresentam dois pontos de fusão, por se arranjam nas formas amorfa e cristalina ao mesmo tempo. O primeiro, mais baixo, acontece na temperatura de transição vítrea (T_g), na qual as cadeias que formam os cristais se desprendem umas das outras se tornando amorfas. A temperatura de fusão (T_m) é a mais elevada, na qual as cadeias adquirem mobilidade, e o polímero se torna viscoso, podendo ser moldado. Essas duas temperaturas assim como as energias térmicas (entalpia, ΔH) necessárias para que as transições das amostras ocorram podem ser observadas na Tabela 4 e Figura 3. Todas amostras apresentaram transições endotérmicas com T_g e T_m acima de 100 °C. O FP foi o filme que apresentou menor T_g e T_m , com o menor gasto de energia (4,43 J/g) para que essas transições ocorressem, indicando uma matriz mais frágil, com fracas ligações entre os componentes e de menor resistência térmica quando comparada aos demais filmes e blendas. Quanto mais fortemente ligados estiverem os componentes das matrizes, maior será a energia necessária para que as reações de transição ocorram (MOTHÉ, 2009).

Tabela 4 - Temperatura de transição vítrea (T_g), de fusão (T_m) e entalpia (ΔH) obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e perda de massa até o ponto de fusão obtida por análise termogravimétrica (TGA) dos filmes e blendas

Filmes	DSC			TGA
	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH (kJ/kg)	Perda de massa (%) até T_m (°C)
FP	105,03	108,19	4,43	9,6
FG	121,59	124,77	12,46	9,0
FZ	119,09	130,70	8,50	6,2
BL Z+G	130,54	132,22	11,03	6,5
BL P+G	120,40	123,84	27,28	10,8

FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BL Z+G: blenda de zeína e glúten; BL P+G: blenda de isolado proteico de pescada e glúten de trigo; Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A perda de massa até o ponto de fusão do filme é de grande relevância, uma vez que se houver perda de massa até T_m , indica que nem todos componentes dos filmes estão ligados, ficando livres dessa forma para sofrer essas transições.

A análise termogravimétrica (TGA) apresentada na Figura 4, observa-se que as amostras se degradaram principalmente em três estágios, sendo que de acordo com Wilhelm et

al. (2003) inicialmente ocorre a perda de água, seguida pelo início da degradação dos constituintes dos filmes e posteriormente as transições finais.

Figura 3 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo

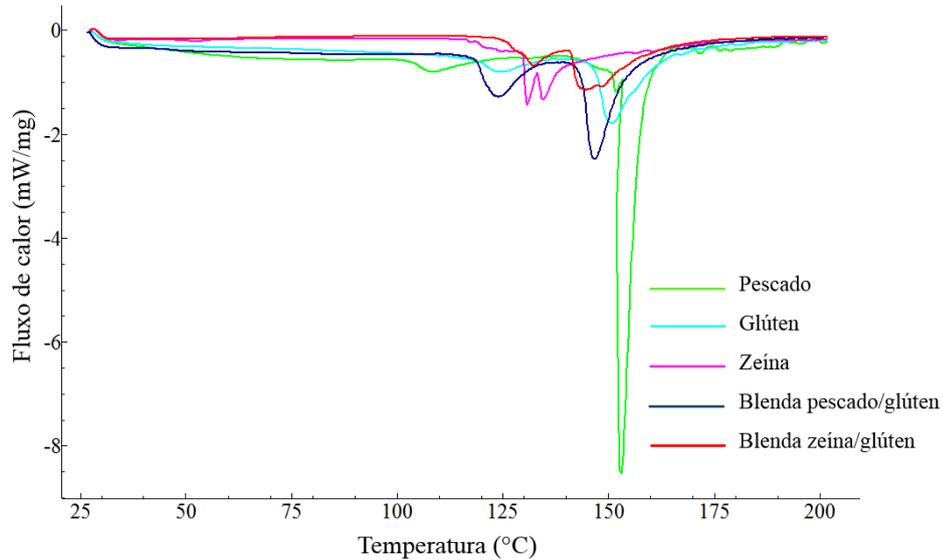
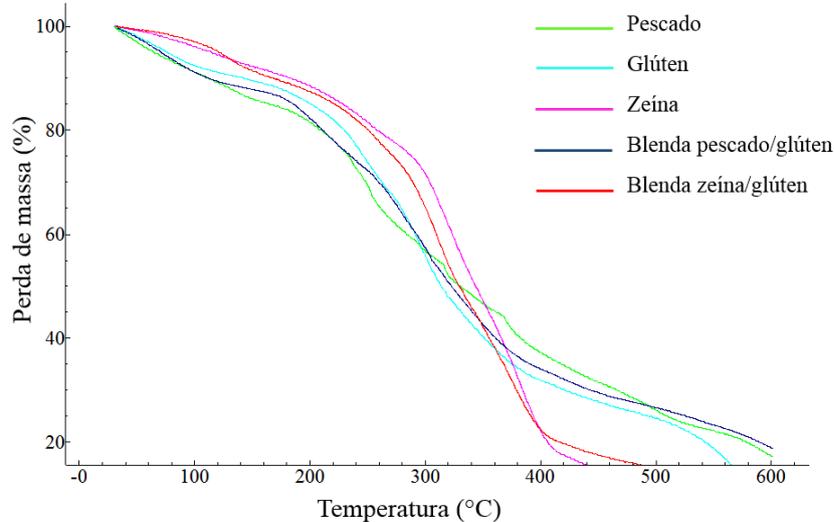


Figura 4 - Análise termogravimétrica (TGA) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo



A perda de massa determinada na análise de TGA até a temperatura de fusão (T_m) das matrizes indica a perda de água e de álcool, visto que a maior T_m foi obtida para a blenda

de zeína com glúten, que ocorreu a 132,2 °C. Acima dessas temperaturas, os demais componentes dos filmes já não se encontram mais ligados, e dessa forma ficam livres para sofrer outras transições.

Como não houve perda de massa significativa nessa faixa de temperatura de acordo com a análise de TGA (Tabela 4), acredita-se que a água presente nas amostras não estava livre para que ocorressem mudanças de estado físico das amostras, exceto para FP, que teve sua T_g e T_m mais próximas de 100 °C.

3.3.4 Propriedades microestruturais

De acordo com Pastor et al. (2010), a estrutura final do filme depende das interações entre os componentes da formulação e a sua disposição na formação durante a etapa de secagem. A visualização a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a identificação da incorporação dos materiais formando uma estrutura homogênea ou, ainda, a separação dos mesmos originando uma estrutura heterogênea (HALLAL, 2012).

As eletromicrografias da superfície (Figura 5) e da lateral (Figura 6) dos filmes foram utilizadas para melhor elucidar a relação entre as características superficiais e internas e as propriedades apresentadas pelos materiais desenvolvidos. Ao observar as imagens verifica-se que nenhum dos filmes apresentou superfície totalmente compacta e lisa.

Nas imagens da superfície do filme e blenda de zeína (Figura 5 C e D, respectivamente) é possível observar as superfícies irregulares e rugosas, o que pode justificar o comportamento observado nas propriedades de solubilidade em água e PVA que demonstraram serem maiores quando comparadas aos demais filmes, em virtude das irregularidades apresentadas pelas matrizes formadas. Nas imagens laterais com diferentes aproximações desses filmes (Figura 6: C 1, C 2, D 1 e D 2) nota-se a presença de lipídios, por meio da presença de estruturas arredondadas, mostrando que não houve interação efetiva entre a zeína e o azeite de oliva. Esta observação também foi relatada para filmes de zeína elaborados por outros autores (ALMEIDA, 2010; DONG; SUN; WANG, 2004; GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2008).

De acordo com Souza (2011), as superfícies irregulares de filmes acrescidos de óleo ocorrem devido à separação das fases ou maior tensão de superfície, resultando em maiores descontinuidades nas estruturas dos filmes e, possivelmente proporcionando a formação de caminhos preferencias para a difusão de vapor de água, aumento da permeabilidade ao vapor de água nesses filmes. Sobral et al. (2001) ainda relatam que a separação de fases pode causar perda de elasticidade de filmes poliméricos.

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C), blenda zeína e glúten de trigo (D) e blenda pescada e glúten de trigo (E)

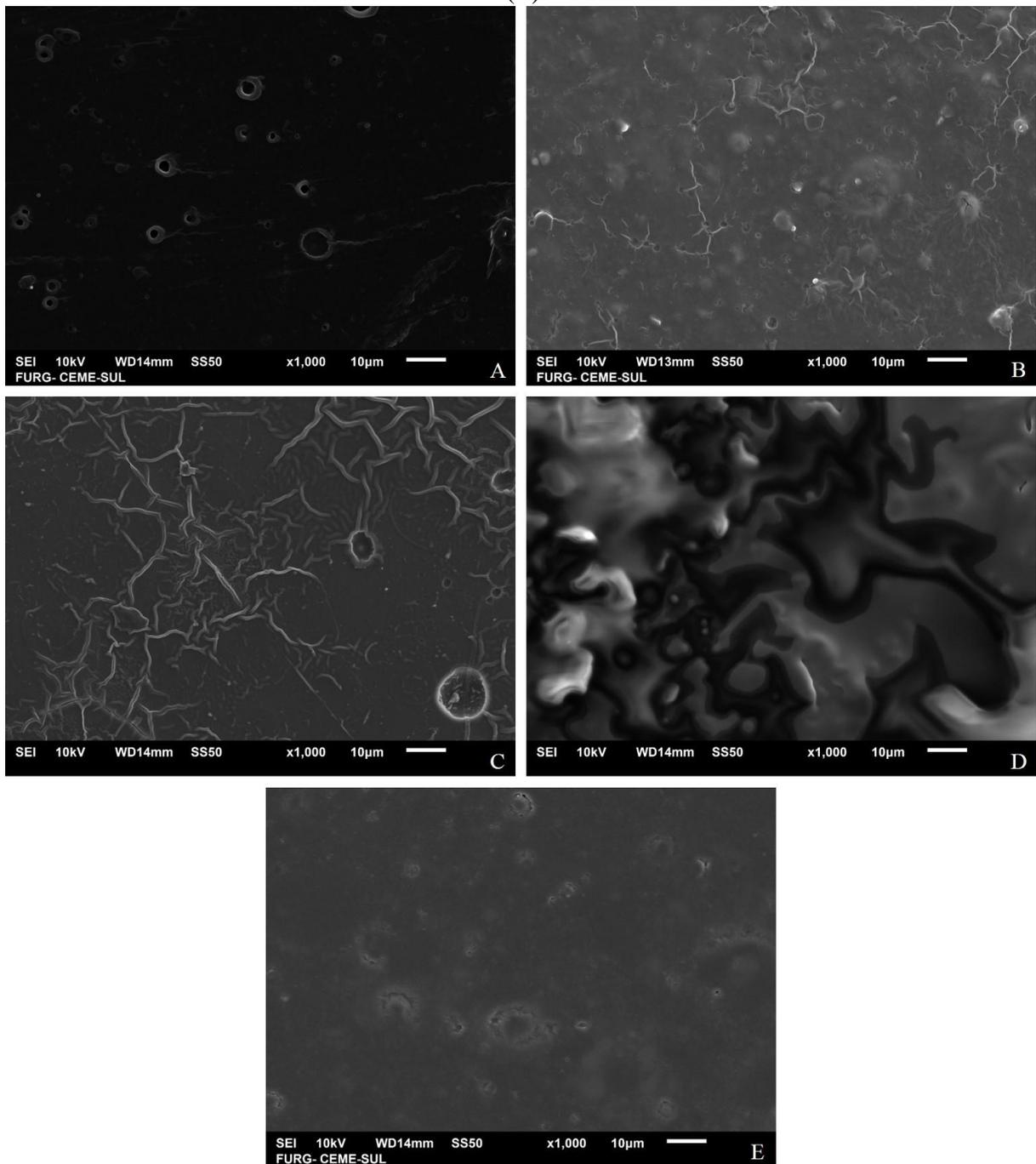
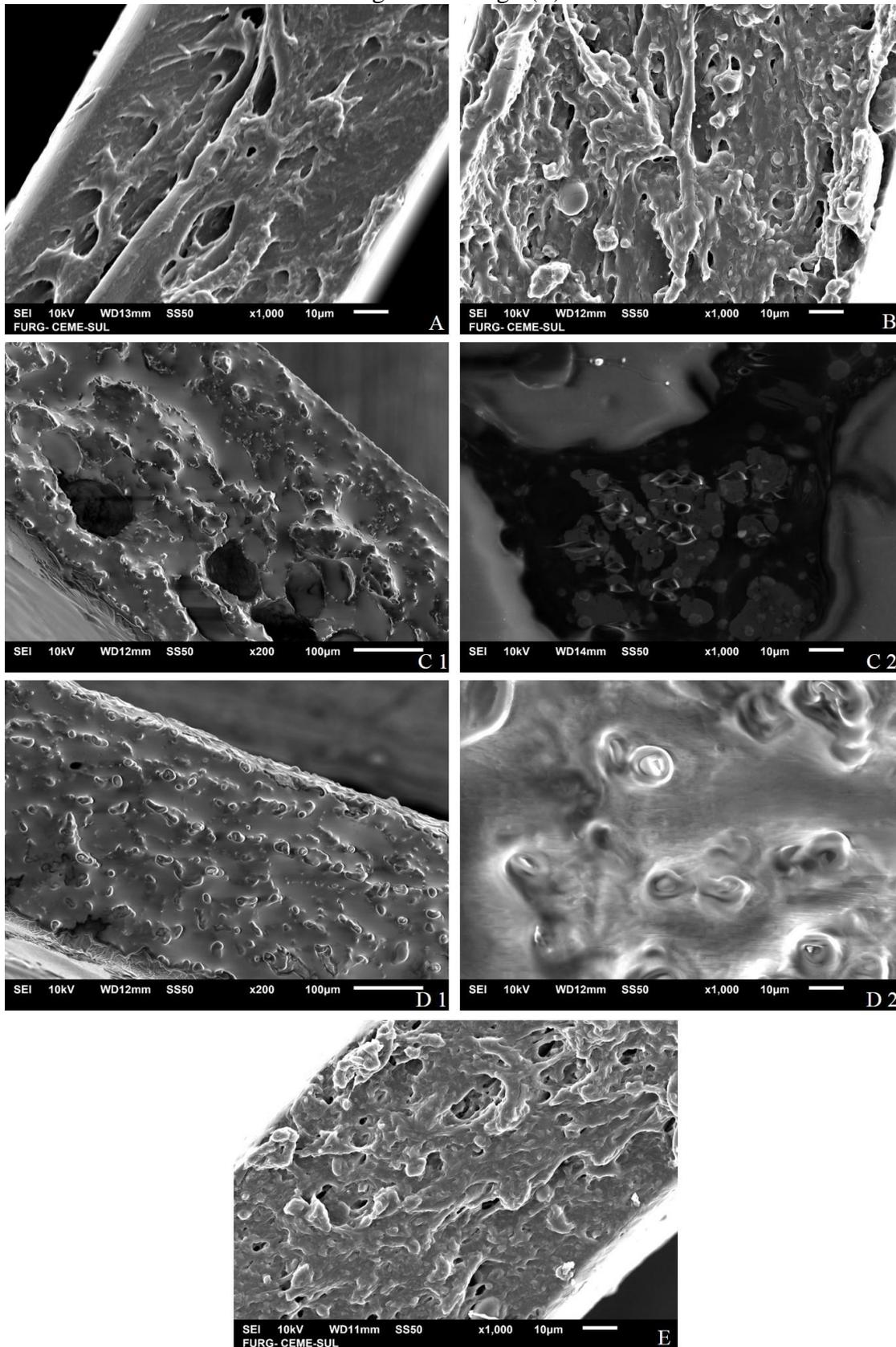


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura lateral de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C1 e C2), blenda zeína e com glúten de trigo (D1 e D2) e blenda pescada e glúten de trigo (E)



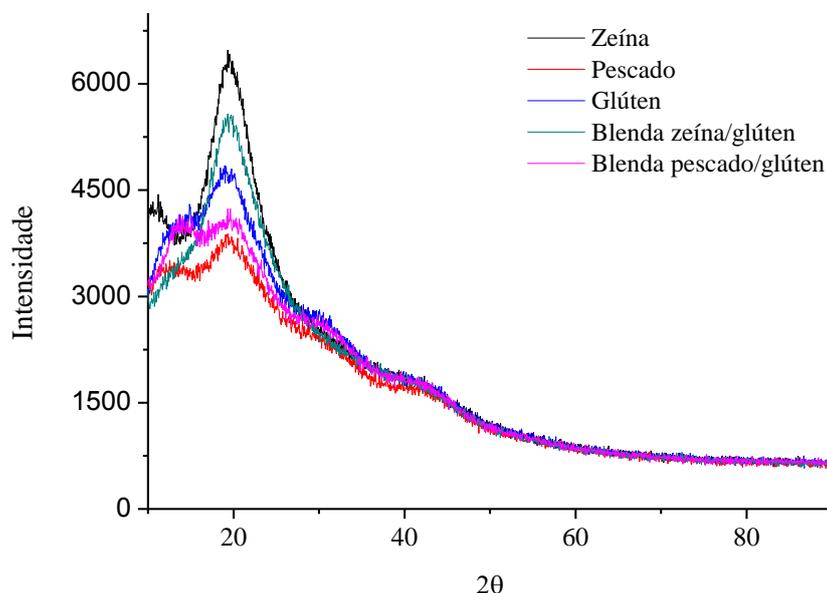
Os filmes constituídos de glúten de trigo e proteínas musculares de pescada, assim como a blenda de glúten com pescada apresentaram superfície mais lisa quando comparados aos filmes de zeína (Figura 5), entretanto, ao observar as imagens de seção lateral (Figura 6) é possível visualizar a descontinuidade e formação de uma matriz desordenada proporcionando a formação de vias para a passagem do vapor de água. Acredita-se que a formação dessas vias ocorra durante o processo de secagem para eliminação do ar incorporado durante a agitação no processo de elaboração do filme (BENAVIDES; VILLALOBOS-CARVAJAL; REYES, 2011; BODINI, 2011). Desta forma, sugere-se a adição de uma etapa ou processo que possibilite a retirada do ar das soluções filmogênicas antes da secagem para formação de uma estrutura mais ordenada e compacta com menor PVA.

Segundo Cortes (2015), a fração de volume de lipídios no filme seco e o tamanho dos agregados lipídicos são os principais fatores envolvidos no grau de heterogeneidade do filme.

A Figura 7 apresenta o difratograma de Raios X, o qual pode ser dividido e ajustado em duas partes: uma amorfa e a outra cristalina. De acordo com Fakhouri (2009) e Almeida (2010) a presença de picos acentuados indica regiões cristalinas, tais regiões cristalinas são claramente observadas nos picos definidos na região de 2θ entre $18,5$ e 21° para todos os filmes, sendo mais intensos para o filme de zeína e blenda zeína/glúten. Comportamento semelhante foi relatado por Almeida (2010) ao avaliar filmes de zeína com diferentes óleos. A maior intensidade do pico em torno de 21° dos filmes de zeína, seguido pela blenda de zeína/glúten suporta o comportamento inferior das propriedades mecânicas mais baixas de tais filmes, uma vez que estes tendem a estruturas mais cristalinas quando comparado aos demais, pois possuem picos mais agudos.

Segundo Almeida (2010), um polímero amorfo pode ser caracterizado pela presença de picos mais alargados. Desta forma, pode-se afirmar que os filmes de proteína muscular de pescada e glúten, assim como a blenda pescada/glúten apresentaram picos mais amorfos quando comparados aos filmes contidos de zeína. O estado amorfo caracteriza-se pelo arranjo desordenado das moléculas apresentando uma configuração metaestável. A presença de picos difusos e largos em materiais amorfos deve-se ao fato de que neste estado, as moléculas estão arranjadas desordenadamente produzindo bandas dispersas. Ao passo que materiais cristalinos por estarem em um estado altamente ordenado produzem picos afiados e definidos.

Figura 7 - Difrátograma de raios X de filmes de zeína, pescada, glúten de trigo, blenda de zeína e glúten de trigo e blenda de pescada e glúten de trigo



Desta forma, é possível dizer que os filmes contidos de zeína, que tenderam ao cristalino, apresentaram-se com propriedades mecânicas mais baixas, enquanto os demais filmes e blendas obtiveram propriedades mecânicas melhores, adequando-se ao comportamento esperado por serem filmes mais amorfos.

3.4 BIODEGRADABILIDADE DOS FILMES E BLENDA EM SOLO

A partir da Tabela 5 observa-se que os filmes de pescada, glúten e a blenda de pescada com glúten, apresentaram 100% de degradação já nos 10 primeiros dias de experimento. A blenda glúten mais zeína apresentou uma degradação crescente, chegando aos 100% de perda de massa aos 40 dias, enquanto que os filmes de zeína chegaram ao máximo de 74,5% de perda de massa aos 60 dias de experimento. Essa perda de massa pode estar relacionada a perda de compostos solúveis em água e compostos de baixo peso molecular, como o glicerol, e também a atividade microbiana, especialmente pela degradação enzimática. De acordo com Arancibia et al. (2014), estes filmes podem ser considerados de rápida biodegradação.

A umidade média do solo durante o período de biodegradação foi de $29,1 \pm 3,2\%$, umidade relativa de $76,2 \pm 2,3\%$ e temperatura média de $19,9 \pm 0,1$ °C. A contagem total

estimada de bactérias mesófilas no solo foi de 2×10^4 UFC/mL e de fungos foi de 3×10^3 UFC/mL.

Tabela 5 - Perda de massa dos filmes e blendas durante o período de biodegradação

Filmes	Perda de massa (%)					
	10 dias	20 dias	30 dias	40 dias	50 dias	60 dias
Pescada	100	100	100	100	100	100
Glúten	100	100	100	100	100	100
Zeína	42,4 ± 3,1	45,7 ± 3,1	48,5 ± 3,6	55,6 ± 5,8	67,1 ± 2,5	74,5 ± 7,7
Blenda P+G	100	100	100	100	100	100
Blenda G+Z	48,2 ± 0,3	51,1 ± 3,5	65,8 ± 1,1	100	100	100

O comportamento de degradação de biopolímeros pode ser influenciado pelas condições ambientais, especialmente composição do solo, presença de micro-organismos e condições de umidade (ARANCIBIA et al., 2014). González, Strumia e Igarzabal, (2011) verificaram que todos os materiais absorvem água (em maior ou menor extensão), perdendo depois a sua forma inicial e integridade estrutural, favorecendo assim o processo de biodegradação das matrizes.

4 CONCLUSÃO

A utilização de proteínas provenientes de fontes animal e vegetal demonstrou ser promissora na obtenção de filmes e blendas para desenvolvimento de embalagens sustentáveis de alimentos. As proteínas de pescada, glúten e zeína, foram capazes de originar filmes com diferentes características, podendo estes serem direcionados para diversas aplicações.

As proteínas de pescada originaram filmes mais resistentes e solúveis em água, enquanto que os filmes de glúten apresentaram maior alongamento na ruptura e menor solubilidade, mostrando serem os mais indicados para o desenvolvimento de materiais de embalagem. Os filmes de zeína apresentaram baixas propriedades mecânicas e alta solubilidade. Com o desenvolvimento das blendas, observou-se que estas apresentaram propriedades intermediárias quando comparadas aos componentes utilizados em separado, evidenciando a combinação das características das diferentes matérias-primas utilizadas. A blenda produzida com proteínas de pescada e glúten mostrou ser a mais adequada para aplicações em alimentos com baixa atividade de água, devido as propriedades mecânicas, maior

resistência térmica, baixa opacidade e estrutura mais homogênea apresentada por esta quando comparadas com os demais filmes elaborados.

Com exceção dos filmes de zeína, todos os demais foram biodegradáveis em 60 dias em solo, o que é de suma importância devido as preocupações ambientais acerca da ampla utilização dos polímeros provenientes de fontes petrolíferas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. B. de. **Características estruturais e funcionais de biofilmes de zeína e óleos vegetais comestíveis**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2010.

AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C, 2000.

AQUINO, V. C. de. **Estudo da estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ARANCIBIA, M. Y.; LOPEZ-CABALLERO, E.; GÓMEZ-GUILLEN, M. C.; MONTERO, P. Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. **Food Control**, v. 44, p. 7-15, 2014.

ARFAT Y.A.; BENJAKUL S.; PRONDPRAN T.; OSAKO, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 58–67, 2014.

ASTM. **Standards pertaining to the biodegradability and compostability of plastics D20-96**, Philadelphia, 1999.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-00. In: **Annual Book of ASTM Standards**. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 2000.

ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-02. In: **Annual Book of ASTM Standards**. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 2002.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and orégano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, (Online), 2011.

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais polimericos bioativos a base de gelatina e própolis**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V.; YAMASHITA, F. Hidrofilicidade de filmes de amido/poli (butileno adipato co-teraftalato) (pbat) adicionados de tween 80 e óleo de soja. **Polímeros**, São Carlos, v. 23, n. 2, p. 270-275, 2013.

CHINMA, C.E.; ARIAHU, C.C.; ABU, J.O. Development and characterization of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. **International Journal of Food Science Technology**, v. 47, p. 383–389, 2012.

CORTES, M. S. **Características estruturais e físicas de material biodegradável produzido a base de zeína e fibras de milho e bananeira**. 2015. 99f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade |Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

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

DICK, M. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir da semente e da mucilagem de Chia (*Salvia hispanica* L.)**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DONG, J.; SUN, Q. S.; WANG, J. Y. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. **Biomaterials**, Surrey, v. 25, n. 1-28, p. 4691-4697, 2004.

FAKHOURI, F. M. **Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina**. 2009. 249 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

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

FREITAS, I.R.; GAUTÉRIO, G. V.; RIOS, D. G.; PRENTICE, C. Functionality of protein isolates from argentine anchovy (*engraulis anchoita*) residue obtained using ph shift processing. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 1, n. 5, p. 374-378, 2011.

GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1835-1839, 1993.

GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 2, p. 209–215, 2008.

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

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water-vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal Food Science**, v. 58 n. 1, p. 206–211, 1993.

GONZÁLEZ, A.; STRUMIA, M. C.; IGARZABAL, C. I. A. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. **Journal of Food Engineering**, v. 06, p. 331–338, 2011.

HAGER, ANNA-SOPHIE.; VALLONS, K. J. R.; ARENDT, E. K. Influence of gallic acid and tannic acid on the mechanical and barrier properties of wheat gluten films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6157–6163, 2012.

HALLAL, L. M. E. **Desenvolvimento e caracterização de filmes a base de isolado proteico de resíduos de corvna (*Micropogonias furnieri*) e óleo de palma**. 2012. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 30–39, 2008.

IBGE, 2017. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201701_4.shtm.
Acesso em: 07 de março de 2017.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; LENART, A.; VOILLEY, A. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, v. 20, 53–60, 2010.

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

MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starchburied under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 20– 28, 2014.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R.A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatina. under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 1307–1313, 2009.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 377–383, 2010.

OZCALIK, O.; TIHMINLIOGLU, F. Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 4, p. 505–513, 2013.

PAPALIA, I. da S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 2, p. 552-559, 2015.

PASTOR C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L.; CHÁFER M.; CHIRALT M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1174–1183, 2010.

PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 439-449, 2013.

RIBEIRO, W. X. **Caracterização de biofilme a base de zeína e ácido oleico adicionada de nanocarbonato**. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade |Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

RIBEIRO, W. X.; LOPES-FILHO, F. F.; CORTES, M. S. Characterization of biodegradable film based on zein and oleic acid added with nanocarbonate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 10, p. 1890-1894, 2015.

ROCHA, M.D., LOIKO, M.R., GAUTÉRIO, G.V., TONDO, E.C., PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666–673, 2013.

ROMANI, V. P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MARTINS, V. G. Active and sustainable materials from rice starch, fish protein and oregano essential oil for food packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 268–274, 2017.

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

SANCHEZ-GARCIA, M. D.; HILLIOU L.; LAGARON J. M. Nanobiocomposites of carrageenan, zein, and mica of interest in food packaging and coating applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6884–6894, 2010.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Livraria Varela Ltda. São Paulo, SP, 1997.

SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGUER, M. D.; ROQUES, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 423-432, 2001.

SOUZA, V. C. **Produção de filmes biopoliméricos a partir de quitosana com incorporação de fração lipídica**. 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SUN, Q.; SUN, C.; XIONG, L., 2013. Mechanical, barrier and morphological properties of pea starch and peanut protein isolate blend films. **Carbohydrate Polymers**, v.98, p. 630–637, 2013.

TADPITCHAYANGKON, P.; PARK, J. W.; MAYER, S. G.; YONGSAWATDIGUL, J. Structural changes and dynamic rheological properties of sarcoplasmic proteins subjected to ph-shift method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4241–4249, 2010.

TAVARES, L. L.; ALMEIDA, C. B. de; CARUSO, Í. P.; CORNÉLIO, M. L.; LOPES FILHO, J. F. Effect of modified clays on the structure and functional properties of biofilms produced with zein. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.32, n.2, p.314-322, 2012.

TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, İ. D.; ÖZEN, B. Effect of corn-zein coating on the mechanical properties of polypropylene packaging films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 235–241, 2011.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 62f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo. 2003.

WIHODO, M.; MORARU, C.I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films. **Journal of Food Engineering**, v.114, p. 292–302, 2013.

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

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

ZAVAREZE, E. R.; EL HALAL, S. L. M.; SILVA, R. M.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE, HERNÁNDEZ, C. Mechanical, barrier and morphological properties of biodegradable films based on muscle and waste proteins from the Whitemouth Croaker (*Micropogonias F*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1-9, 2013.

ARTIGO II

FILMES BICAMADAS BIODEGRADÁVEIS ELABORADOS A PARTIR DE PROTEÍNAS DE GLÚTEN DE TRIGO, ZEÍNA DE MILHO E ISOLADO PROTEICO DE PESCADA

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo desenvolver e caracterizar filmes individuais e bicamadas poliméricas constituídas por diferentes tipos de proteínas, e avaliar a biodegradabilidade destes polímeros. Foram elaborados, através da técnica de *casting*, filmes individuais e bicamadas a partir de proteínas de glúten de trigo, zeína de milho e isolado proteico de pescada. Os filmes de proteínas de pescada, assim como as bicamadas de pescada com zeína e de pescada com glúten (BI P+G) apresentaram maior resistência à tração, enquanto os filmes de glúten apresentaram maior alongamento na ruptura (AR) e solubilidade mais baixa. Além de apresentar boa resistência a tração, a BI P+G apresentou o melhor AR quando comparada as demais bicamadas e ao filme de zeína (FZ), entretanto, sua permeabilidade ao vapor d'água foi uma das maiores. Os FZ apresentaram baixas propriedades mecânicas e foram os únicos que não se degradaram completamente em 60 dias. Todos os filmes e bicamadas atingiram suas temperaturas de fusão e de transição vítrea em temperaturas acima de 100 °C. As eletromicrografias de todos os filmes apresentaram superfície irregular com poros e ranhuras, sendo estas, menos pronunciadas na BI P+G. Nas bicamadas produzidas, não foi necessário utilizar nenhum tipo de adesivo para formar uma estrutura única. Acredita-se que a BI P+G seja a mais indicada para o desenvolvimento de materiais de embalagem para alimentos, devido as suas propriedades mecânicas, óticas e estruturais terem sido melhores quando comparadas aos demais filmes.

Palavras-chave: Bicamada proteica. Biodegradação. Embalagens. Filmes biodegradáveis. Proteínas.

1 INTRODUÇÃO

A elaboração de filmes bicamadas a partir de diferentes fontes renováveis, que possam ser utilizados como embalagens de alimentos, têm se tornado uma alternativa promissora no que diz respeito a minimização dos impactos ambientais causados pelas embalagens derivadas de matérias primas sintéticas, e também atuam na melhoria das propriedades de filmes individuais (GHERARDI et al, 2016). Filmes bicamadas podem ser elaborados a partir de proteínas de origem vegetal, como o glúten do trigo e a zeína de milho, proteínas de origem animal como as de pescado, e também de polissacarídeos como amido de milho e de arroz, sendo que a combinação adequada dessas matrizes pode levar a melhoria das propriedades desses filmes (ARFAT et al., 2017; MELLINAS et al., 2016). Estes polímeros apresentam vantagens na sua utilização comercial, tais como, não toxicidade, biocompatibilidade, propriedades de barreira ao vapor d'água e/ou gases, baixo custo e fácil obtenção.

A formulação destes filmes envolve, além da matriz principal (proteína, polissacarídeo, dentre outros polímeros), o uso de solventes e plastificantes, que aumenta a flexibilidade da rede polimérica. O método de *casting* está entre os mais utilizados para a obtenção de filmes biodegradáveis, principalmente em escala laboratorial. Este método se baseia na fundição dos componentes em uma solução, com posterior moldagem em superfícies planas e inertes, seguida de secagem sob condições controladas para remoção do solvente e formação da película (MELLINAS et al., 2016).

Proteínas podem sofrer uma variedade de interações intermoleculares e, assim, serem utilizadas na elaboração de filmes biodegradáveis (NIE et al., 2015). Porém, a baixa resistência ao vapor de água de filmes de proteína e sua resistência mecânica menor em comparação aos polímeros sintéticos, limitam a sua aplicação em embalagens de alimentos. Desta forma, vários estudos vêm sendo realizados em uma tentativa de melhorar o desempenho dos filmes de proteína (CINELLI et al., 2014; CHO; LEE; RHEE, 2010; FERREIRA; RUIZ; GASPAR-CUNHA, 2014; GONZÁLEZ; IGARZABAL, 2013).

A elaboração de filmes bicamadas é uma técnica que produz uma única estrutura constituída por dois ou mais polímeros individuais, com o objetivo de combinar as propriedades desses materiais, melhorando assim as suas características gerais, propriedades mecânicas e de barreira (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2009).

Deste modo, objetiva-se com o presente estudo desenvolver e caracterizar filmes individuais e bicamadas poliméricas constituídas por diferentes tipos de proteínas, e avaliar a biodegradabilidade destes polímeros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A zeína de milho com teor proteico de 88% (m/v) foi adquirida da Sigma Aldrich[®], o glúten de trigo com teor proteico de 72% (m/v) foi adquirido da Foco Alternativo[®]. Azeite de oliva e emulsificante Emustab[®] foram adquiridos no comércio local e armazenados ao abrigo da luz em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) até o momento do uso. As aparas de pescada (*Cynoscion guatacupa*) foram gentilmente fornecidas pela empresa Torquato Pontes S/A (Rio Grande – Rio Grande do Sul) e acondicionadas a -18 °C até o momento do uso.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção do isolado proteico

Para a obtenção do isolado proteico foram utilizadas as aparas de pescada. A extração das proteínas ocorreu conforme método descrito por Freitas et al. (2011), diferindo apenas no pH de solubilização (pH 11,5). A matéria-prima foi homogeneizada com água destilada na proporção 1:9 (m/v) e triturada em blender (METVISA, 1322, Brasil) por 1 min. Após, foi realizada a solubilização das proteínas com adição de NaOH 1 mol/L a 4 °C em banho ultratermostático (QUIMIS, 0214M2, Brasil) durante 20 min sob agitação constante com agitador de eixo-hélice (IKA, RW20DZM.n, Alemanha). As proteínas solubilizadas foram então centrifugadas a $9000 \times g$ por 20 min a 4 °C para separá-las dos lipídios (fase superior) e das proteínas insolúveis (fase inferior). As proteínas solúveis (fase intermediária) foram colocadas novamente no banho ultratermostático a 4 °C durante 20 min sob agitação constante com agitador de eixo-hélice, e foram precipitadas ao atingir o ponto isoelétrico (pH 5,5), com adição de HCl 1 mol/L. A seguir, foi realizada uma segunda centrifugação a $9000 \times g$ por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi submetido à secagem a 40 °C em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil) por aproximadamente 12 h. Após seco,

foi triturado em moinho de facas (TECNAL, TE-633, Brasil), peneirado (Mesh 42), e armazenado em embalagem de vidro a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior uso.

2.2.2 Caracterização das matérias-primas e do isolado proteico

As matérias-primas e o isolado proteico de pescada foram avaliadas quanto a sua composição proximal através dos métodos oficiais da AOAC (2000), umidade em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (método 950.46), proteína bruta pelo método micro-Kjeldahl (fator de conversão 6,25) (método 928.08), lipídios totais em extrator de Soxhlet (método 960.39) e, para matéria mineral com incineração em mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ (método 920.153). Carboidratos foram determinados por diferença. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.3 Elaboração dos filmes individuais

Os filmes foram obtidos pelo método de *casting*, que se baseia na elaboração de uma solução coloidal das proteínas com os aditivos. As soluções filmogênicas foram homogeneizadas em banho termostático (BROOKFIELD, TC-102, Estados Unidos) acoplado a um reator encamisado de vidro e mantidas sob agitação com o auxílio de um agitador mecânico (FISATOM, 712, Brasil). Ao final da dissolução, a secagem dos filmes ocorreu em estufa com circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil), após o espalhamento das soluções em placas de Petri com diâmetro de 8,7 cm. Posteriormente a secagem, todos os filmes foram armazenados em dessecadores com umidade relativa de $55 \pm 2\%$ controlada com Brometo de Sódio (NaBr), e temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por no mínimo 48 h, para posteriores análises.

2.2.4 Elaboração dos filmes de isolado proteico de pescada

A elaboração dos filmes de proteínas de pescada, seguiu o método descrito por Zavareze et al. (2013). Inicialmente, o isolado proteico, na concentração de 5% (m/v) foi dissolvido em água destilada, e então, foi adicionado glicerol na proporção de 25% em relação a massa total de sólidos. Esta dispersão foi mantida sob agitação constante por 30 min a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após, o pH da solução foi ajustado para 11,5 com NaOH 1 mol/L mantendo-se a agitação por mais 10 min. Em seguida a temperatura foi elevada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação por mais 20 min, mantendo-se o pH. Após, a solução foi filtrada em tecido de nylon, vertida em placas de Petri, e seca a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h.

2.2.5 Elaboração dos filmes de glúten de trigo

A elaboração dos filmes de glúten de trigo seguiu o método descrito por Gontard, Guilbert e Cuq (1993), com adaptações. A formação da solução filmogênica (100 mL) ocorreu com a dispersão do glúten na concentração de 8% (m/v) em 45 mL de etanol absoluto, com adição de glicerol na proporção de 25% (m/m) e 0,025 g de sulfito de sódio, ambos previamente dissolvidos em água destilada. A solução foi mantida sob agitação por 10 min à temperatura ambiente. Água destilada foi adicionada até completar o volume de 100 mL, e o pH 11 foi alcançado com a adição de NaOH 1 mol/L. Após, ocorreu a elevação da temperatura a 45 °C e a solução foi mantida sob agitação constante por 30 min. Terminado este período, a solução foi filtrada em tecido de nylon para remoção de partículas não solubilizadas, vertida em placas de Petri que foram secas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 24 h.

2.2.6 Elaboração dos filmes de zeína de milho

A elaboração dos filmes de zeína de milho seguiu o método descrito por Almeida (2010) com modificações. Zeína e etanol (95%) (20 g de zeína/100 mL de etanol) foram submetidos à agitação por 10 min. Após, adicionou-se azeite de oliva (70 g/100 g de proteína), glicerol (20 g/100 g de proteína) e emulsificante Emustab (5 g/100 g de proteína). Elevou-se a temperatura até 65 °C e manteve-se a agitação por mais 15 min. Ao final do processo, a solução foi vertida em placas de Petri que foram submetidas à secagem a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 24 h.

2.2.7 Elaboração das bicamadas

Os filmes bicamadas foram preparados de acordo com González e Igarzabal (2013), pelo método de *casting*. Primeiramente foi obtido um filme individual, que foi seco nas placas de Petri com diâmetro de 8,7 cm, e sobre este, verteu-se uma segunda solução filmogênica. Por fim, ambos foram secos em estufa com temperatura controlada e circulação forçada de ar (QUIMIS, 314D, Brasil), de acordo com as condições de secagem requeridas para cada filme. Posteriormente a secagem das bicamadas, todas foram armazenadas em dessecadores com umidade relativa de $55 \pm 2\%$ controlada com Brometo de Sódio (NaBr), e temperatura de 25 ± 2 °C, por no mínimo 48 h, para posteriores análises.

Para elaboração da bicamada de isolado proteico de pescada com zeína, inicialmente preparou-se o filme de pescada individualmente e, ao final da secagem deste, verteu-se a solução filmogênica de zeína. Na elaboração da bicamada de zeína com glúten, inicialmente preparou-se o filme de zeína e após a sua secagem, verteu-se a solução filmogênica de glúten na mesma placa. Para elaboração da bicamada de pescada com glúten, inicialmente preparou-se o filme de pescada e ao fim de sua secagem foi vertida a solução filmogênica de glúten na mesma placa. Todas as bicamadas foram secas por 18 h a 30°C em estufa com circulação de ar forçada e, ao final da secagem foram acondicionadas em dessecadores para posteriores análises.

2.2.8 Caracterização dos filmes

2.2.8.1 Espessura

A espessura (mm) dos filmes foi determinada utilizando micrômetro digital (INSIZE IP54, Brasil) em dez pontos diferentes, sendo um no centro e os demais na periferia dos filmes.

2.2.8.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi determinada segundo método proposto por Gontard et al. (1994). Os filmes foram cortados em discos de 2 cm de diâmetro e levados à estufa (DELEO, A15E, Brasil) a 105 °C para determinação da matéria seca inicial. Após, estes foram imersos em 50 mL de água destilada e mantidos sob agitação de 175 rpm a 25 °C por 24 h. Decorrido esse período as amostras foram removidas e secas a 105 °C para determinação da matéria seca que não se dissolveu. Para o cálculo da solubilidade S (%) foi utilizada a Equação 2. Onde m_i corresponde a massa seca inicial (g) e m_f corresponde a massa seca final (g).

$$S = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

2.2.8.3 Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente segundo o método E96-00 da ASTM (ASTM, 2000), que consiste na pesagem de uma cápsula fechada, contendo o filme na superfície e a substância dessecante (cloreto de cálcio) no interior. A cápsula foi colocada em ambiente com umidade controlada, utilizando solução de cloreto de sódio para manter o ambiente externo a 75 % de umidade relativa. A célula de permeação contendo o filme foi pesada a cada 24 h por 7 dias. Para o cálculo dos valores foi utilizada a Equação 3, em que M é o ganho de massa do CaCl₂ (g); E é a espessura do filme (mm); A é a área de permeação (m²), t é o tempo (dias) e ΔP é o diferencial de pressão de vapor (kPa).

$$PVA = \frac{M.E}{A.t.\Delta P} \quad (2)$$

2.2.8.4 Propriedades óticas

A cor e a opacidade dos filmes foram determinadas utilizando colorímetro (MINOLTA, CR 400, Japão), através do sistema CIEL*a*b. Os parâmetros analisados neste sistema de cores são: L (luminosidade), a* (verde e vermelho) e b* (azul e amarelo). A cor dos filmes foi expressa como diferença total de cor (ΔE*), a qual é calculada conforme Equação 3.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} \quad (3)$$

A opacidade dos filmes foi calculada com a relação entre a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto (Y_{preto}) e ao padrão branco (Y_{branco}), segundo a Equação 4.

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{Y_{\text{preto}}}{Y_{\text{branco}}} \times 100 \quad (4)$$

2.2.8.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas em texturômetro (*Stable Micro Systems*, TA.XTplus, Reino Unido), empregando-se a metodologia ASTM D882- 02

(ASTM, 2002). As propriedades determinadas foram resistência à tração (MPa) e alongamento na ruptura (%). A separação inicial e a velocidade do *probe* foram de 50 mm e 1 mm/s, respectivamente. As amostras foram cortadas em tiras de 85 mm de comprimento e 25 mm de largura. Para a determinação dos valores de resistência à tração (MPa) foi utilizada a Equação 5, em que F é a força no momento da ruptura do filme (N) e A a área da secção transversal do filme (m²).

$$RT = \frac{F}{A} \quad (5)$$

O alongamento na ruptura (AR) foi calculado utilizando a Equação 6, em que df (mm) corresponde a distância final de alongamento do filme, e di (mm) é a distância inicial entre as garras (50 mm).

$$AR (\%) = \frac{df}{di} \times 100 \quad (6)$$

Sendo que df (mm) corresponde a distância final de alongamento do filme, e di (mm) é a distância inicial entre as garras (50 mm).

2.2.8.6 Propriedades térmicas

As propriedades térmicas dos filmes foram determinadas pelas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) segundo o método descrito por Piyada, Waranyou e Thawien (2013). Para a realização da calorimetria exploratória diferencial (DSC) cerca de 4 mg de amostra foram pesadas em cápsulas de alumínio que posteriormente foram hermeticamente seladas. A taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C/min, varrendo uma faixa de temperatura de 30 a 200 °C.

A TGA dos filmes foi realizada utilizando-se uma termobalança de um medidor termoanalítico (SHIMADZU, modelo DTG-60, Japão) em atmosfera estática de ar, com vazão constante de 20 mL/min. A velocidade de varredura foi de 10 °C/min e a faixa de temperatura percorrida de 23 até 550 °C utilizando um porta amostra de alumínio.

2.2.8.7 Propriedades microestruturais

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL), da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6610LV, Tóquio, Japão) operando a 10 kV. As amostras foram depositadas em suportes de alumínio (*stubs*), revestidos com uma fita condutora de carbono. Em seguida, os mesmos foram recobertos com uma fina camada de ouro em *Sputtering* (Desk, Deton Vacuum, Estados Unidos) durante 120 s. Observou-se a morfologia da superfície e a transversal dos filmes com uma ampliação de 1000 x.

2.2.9 Biodegradabilidade dos filmes em solo

A avaliação da degradação dos filmes em solo foi realizada de acordo com o método descrito por Maran et al., (2014) com modificações. Os filmes foram cortados em pedaços retangulares de 2x3 cm, obtendo-se um rendimento de 4 tiras de cada filme. Dessas 4 tiras, um foi utilizado para a determinação da umidade (método oficial AOAC, 2000) e os demais foram pesados em balança analítica (Marte, AY220, Minas Gerais, Brasil) para a determinação da massa inicial. Estes filmes foram acondicionados em cartuchos de tela e colocados a uma profundidade de aproximadamente 8 cm a partir da superfície do solo. O solo utilizado neste ensaio foi composto de 50% de substrato para plantas com umidade máxima de 40% e pH $6,0 \pm 0,5$, e 50% de terra adquirida nas proximidades do Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande – RS. Aproximadamente 5 kg de solo foi colocado em caixas de plástico (10x30x35cm) onde os cartuchos contendo os filmes foram enterrados. Essas caixas foram incubadas a $20 \pm 0,2$ °C por 60 dias e a umidade do solo foi mantida a ($29,1\% \pm 3,2$) em ambiente com umidade relativa de $76,2\% \pm 2,3$ com aspersão de água em intervalos regulares. De 10 em 10 dias amostras (em triplicata) foram retiradas aleatoriamente do solo, lavadas cuidadosamente em água corrente para remoção do solo e secas em estufa a 105 °C até peso constante (aproximadamente 6 h).

A massa de cada amostra foi obtida antes e depois da degradação, e a perda de massa (PM) de cada amostra de filme foi obtida utilizando-se a Equação 7:

$$PM (\%) = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (7)$$

Sendo: M_0 é a massa do filme (em base seca) antes da biodegradação; M_1 é a massa do filme depois da biodegradação.

2.2.9.1 Caracterização do solo

A umidade do solo foi monitorada durante o experimento de 7 em 7 dias de acordo com o método da AOAC (2000). Além disso, foram realizadas análises microbiológicas de contagem total de bactérias mesófilas e contagem total de fungos segundo método descrito por (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997), antes de iniciar o experimento.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor d'água, propriedades óticas e propriedades mecânicas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS

A Tabela 1 apresenta a composição proximal das matérias primas utilizadas para a elaboração dos filmes, todas apresentaram teor proteico maior que 78%, o que pode ser considerado um bom teor proteico. Outros estudos, como Rocha et al. (2013), obtiveram isolado proteico de anchoita com um teor proteico de 88,8% e, Ferreira, Ruiz e Gaspar-Cunha (2014) encontraram teor proteico de 83,0% em glúten de trigo, ambos obtiveram êxito no desenvolvimento de filmes a base destas proteínas.

Tabela 1 - Composição proximal de zeína de milho (ZM), glúten de trigo (GT), aparas de pescada (AP) e isolado proteico (IP).

	Umidade (%)	Cinzas (%)*	Lipídios (%)*	Proteínas (%)*	Carboidratos (%)**
ZM	2,3 ± 0,1	1,5 ± 0,0	3,2 ± 0,1	90,2 ± 0,0	5,1
GT	8,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	78,4 ± 0,4	20,1
AP	83,2 ± 0,1	5,7 ± 0,1	4,1 ± 0,1	90,8 ± 0,3	0,0
IP	5,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	91,3 ± 0,0	5,9

*Dados em base seca; **Carboidratos determinados por diferença; ± desvio padrão

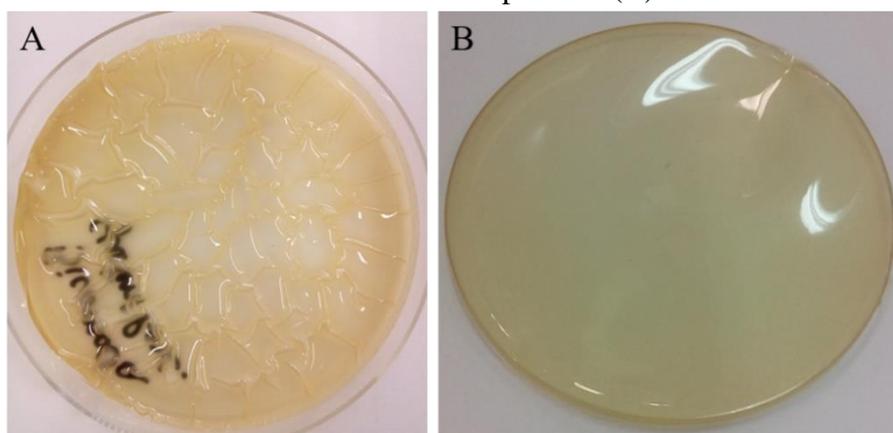
Valores de composição de glúten de trigo e zeína podem variar em função da época e condições de plantio, cultivar e estação do ano. O processo de obtenção e purificação dessas proteínas também pode exercer forte variação em sua composição (FERREIRA; RUIZ; GASPAR-CUNHA, 2014). O elevado teor lipídico encontrado na zeína pode influenciar negativamente nas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor d'água nos filmes desenvolvidos a partir dessa proteína.

Valores de composição proximal das aparas de pescada encontrados no presente estudo encontram-se próximos aos de Lempek, Prentice-Hernandez e Lopes (2001) que avaliaram músculo de pescada. A composição da pescada pode variar conforme os tecidos e estação do ano entre outros fatores (YEANNES; ALMANDOS, 2003).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Durante testes preliminares observou-se que não foi possível elaborar bicamadas quando se utiliza a camada de glúten na parte de baixo (em contato com a placa), pois, ao adicionar a segunda solução sobre este, ocorre a absorção dos líquidos da segunda solução filmogênica pelas proteínas do glúten, a gliadina e glutenina, fazendo com que estas entumeçam, e prejudiquem a formação do filme (Figura 1-A).

Figura 1 - Bicamadas com filme de glúten em baixo (A) e com o filme de glúten por cima do filme de isolado de pescada (B)



Quando a solução de glúten é adicionada acima da solução da proteína de pescada (Figura 1-B), o filme bicamada é formado normalmente, mantendo um aspecto liso e uniforme, pois, como o filme de pescada já está seco, as proteínas do glúten não tem mais de onde absorverem água.

3.2.1 Espessura e propriedades óticas

A Tabela 2 apresenta os valores de espessura, opacidade e diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes individuais e bicamadas. Os valores de espessura obtidos para o filme e as bicamadas de zeína apresentaram a maior espessura, isso ocorreu por causa da alta concentração de zeína que é adicionada na elaboração dos filmes. Os filmes de isolado proteico de pescada e de glúten de trigo apresentaram as menores espessuras e não diferiram entre si.

Hager, Vallons e Arendt (2012) obtiveram 0,017 mm ao avaliarem filmes de glúten de trigo adicionados de ácido gálico. Vedjan et al., (2016) obtiveram espessura de 0,094 mm ao avaliarem bicamadas de gelatina de pescado com agar. Ambos autores encontraram valores inferiores aos encontrados neste estudo, entretanto, a espessura dos filmes elaborados a partir do método de *casting* é de difícil padronização, pois vários fatores podem interferir, como tempo e temperatura de secagem, e quantidade de solução vertida na superfície. Além disso, a composição química dessas proteínas é totalmente diferente, e durante os diferentes processos de elaboração dos filmes, ocorrem modificações químicas em sua estrutura e, na etapa de secagem, com a evaporação da água, as proteínas vão se reorganizando de diferentes formas e ocorrem ligações para formar o polímero, o que também pode influenciar nessa propriedade. A bicamada de pescada com glúten apresentou a soma das espessuras dos mesmos quando individuais.

Tabela 2 - Espessura, opacidade e diferença total de cor (ΔE^*) dos filmes individuais e bicamadas.

Amostras	Espessura (mm)	Opacidade (%)	ΔE^*
FP	0,113 ± 0,001 ^e	10,9 ± 0,5 ^e	15,3 ± 0,3 ^e
FG	0,121 ± 0,002 ^e	13,4 ± 0,3 ^{de}	16,8 ± 1,0 ^e
FZ	0,363 ± 0,002 ^c	36,4 ± 1,2 ^b	73,7 ± 1,6 ^a
BI P+Z	0,435 ± 0,001 ^b	21,2 ± 1,8 ^c	24,1 ± 0,7 ^b
BI Z+G	0,611 ± 0,005 ^a	70,1 ± 2,1 ^a	59,4 ± 1,2 ^c
BI P+G	0,197 ± 0,005 ^d	15,6 ± 0,3 ^d	31,6 ± 0,4 ^d

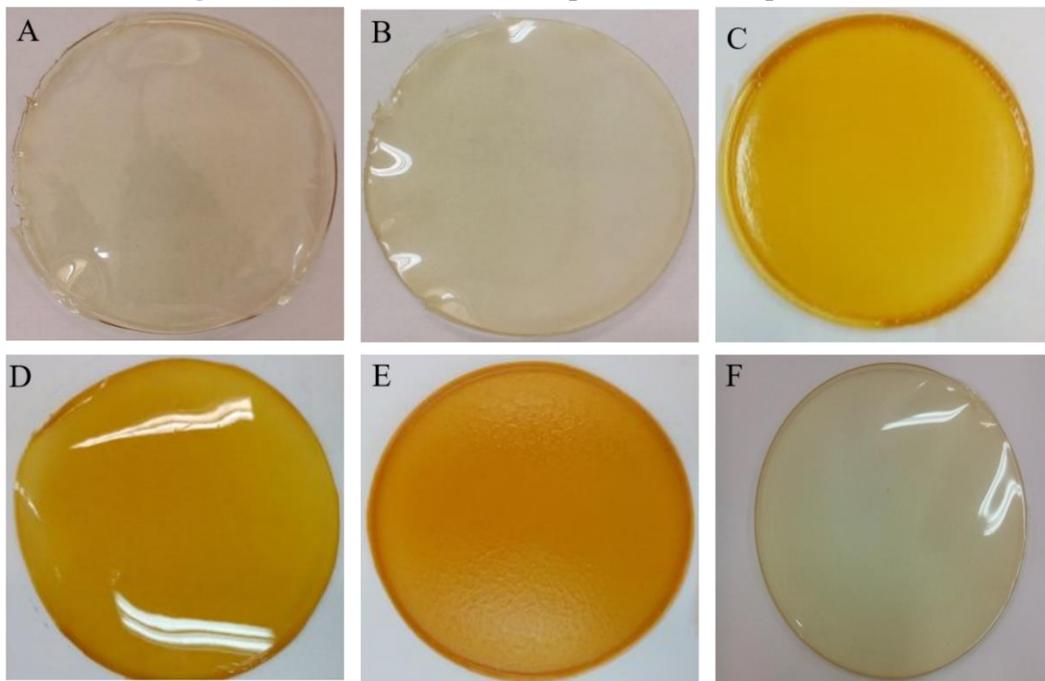
FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BI P+Z: bicamada de isolado proteico de pescada e zeína; BI Z+G: bicamada de zeína e glúten; BI P+G: bicamada isolado proteico de pescada e glúten; Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

Os filmes devem apresentar opacidade e coloração atrativas, e não devem sofrer alteração de cor com o tempo de armazenamento, para não prejudicar a aceitação do produto acondicionado, entretanto não devem ser um fator limitante pois depende da sua aplicação

(DICK, 2014). A opacidade da bicamada zeína com glúten obteve também a maior opacidade quando comparados aos demais filmes e bicamadas, resultado esperado visto que este também apresentou maior espessura quando comparados aos demais e, além disso, a cor amarelada da zeína também contribuiu para isso. A opacidade é um fator importante na escolha de qual produto embalar. Em produtos alimentícios sensíveis a luz, esta bicamada de zeína com glúten seria bem aplicável, pois a transmissão de luz pela embalagem até o produto seria menor quando comparados aos demais filmes analisados.

Por outro lado, existem alimentos que não possuem tanta sensibilidade a luz, e assim, os demais filmes analisados poderiam ser aplicados como embalagens para esses alimentos, visando informar ao consumidor o aspecto do produto que está embalado e tornando o produto mais atrativo. A Figura 2 apresenta as imagens de todos os filmes e bicamadas desenvolvidos.

Figura 2 - Filmes e bicamadas poliméricas de proteínas



A: filme de isolado proteico de pescada; B: filme de glúten de trigo; C: filme de zeína de milho; D: bicamada de pescada com zeína; E: bicamada de zeína com glúten de trigo; F: bicamada de isolado proteico de pescada com glúten de trigo

A coloração amarelada presente nos filmes que possuem zeína pode ser atribuída a concentração de carotenoides, que são amplamente encontrados em diferentes vegetais e possuem cor intensa, que variam do amarelo ao vermelho (ALMEIDA, 2010). Além disso, diferentes estágios de reações de Maillard que ocorrem de acordo com o tempo e a temperatura de formação e secagem das soluções filmogênicas, podem interferir nessas propriedades,

tornando os filmes mais escuros e opacos quanto maiores forem as temperaturas usadas para formação dos filmes, sendo que a reação inversa também é válida (MASTROMATTEO et al., 2008; ROMANI, 2015). Juntando esses fatores a elevada espessura apresentada pelo filme de zeína, já era de se esperar que este apresentasse a maior diferença de cor, tendendo a um filme mais escuro. As bicamadas contidas de zeína também apresentaram diferença total de cor superior quando comparadas aos filmes e bicamadas elaborados com proteína de pescada e glúten, que se apresentaram mais claros e brilhantes (Figura 2).

3.3.2 Propriedades mecânicas, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água

A Tabela 3 apresenta a resistência a tração, alongamento até a ruptura, solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes individuais e das bicamadas. A resistência a tração do filme de pescada e das bicamadas adicionadas dele foram maiores quando comparadas aos demais filmes. No processo de obtenção do isolado proteico de pescado, ocorre o desdobramento das proteínas. Durante a preparação da solução filmogênica essas proteínas desdobradas facilitam o emaranhamento molecular, permitindo assim um maior deslizamento molecular proteico, o que promove maior interação das proteínas tornando um filme mais resistente e com boas propriedades mecânicas (TONGNUANCHAN et al., 2011).

Tabela 3 - Resistência a tração (RT), alongamento até a ruptura (AR), solubilidade em água (SOL) e permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes individuais e das bicamadas.

Amostras	RT (Mpa)	AR (%)	SOL (%)	PVA (g.mm/m ² .dia.KPa)
FP	3,2 ± 0,3 ^a	116,1 ± 1,0 ^c	43,4 ± 0,7 ^a	6,8 ± 0,1 ^c
FG	2,5 ± 0,1 ^b	204,3 ± 2,6 ^a	22,0 ± 0,7 ^d	8,7 ± 0,6 ^c
FZ	2,4 ± 0,2 ^b	0,5 ± 0,0 ^d	31,1 ± 2,9 ^c	13,4 ± 1,2 ^b
BI P+Z	3,4 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,1 ^d	31,3 ± 1,3 ^c	24,1 ± 1,7 ^a
BI Z+G	2,6 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,0 ^d	16,5 ± 1,1 ^e	13,7 ± 1,0 ^b
BI P+G	3,4 ± 0,1 ^a	121,2 ± 0,5 ^b	36,1 ± 1,0 ^b	24,1 ± 1,5 ^a

FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BI P+Z: bicamada de isolado proteico de pescada e zeína; BI Z+G: bicamada de zeína e glúten; BI P+G: bicamada isolado proteico de pescada e glúten; Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

As propriedades mecânicas, resistência à tração e alongamento até a ruptura, são importantes, pois os materiais de embalagem devem oferecer resistência mecânica suficiente

para manter a sua integridade durante o manuseio e armazenamento enquanto o alongamento na ruptura vai depender da aplicação dos mesmos (WIHODO; MORARU, 2013).

Em geral, quanto maior a RT dos filmes, menor vai ser a AR, assim como, quando a AR for maior, a RT vai ser menor, o que aconteceu no filme de glúten, que apresentou maior alongamento na ruptura quando comparado com os demais, entretanto, sua resistência a tração não foi tão boa comparado com o filme de pescada. Gennadios et al. (1993) encontraram valores muito próximos aos obtidos no presente estudo, ao avaliarem as propriedades mecânicas de filmes de glúten de trigo.

O filme de zeína não apresentou diferença significativa na sua RT quando comparado ao filme de glúten a bicamada de zeína com glúten, entretanto, sua AR, foi a menor quando comparado aos demais filmes. Além disso, a zeína influenciou negativamente na AR das bicamadas em que foi adicionada (Tabela 3). A elevada espessura apresentada pelo filme e bicamadas contidas de zeína pode ter influenciado diretamente em suas propriedades, pois estes apresentaram alongamento na ruptura menor quando comparados aos demais filmes.

O filme de pescada apresentou a maior solubilidade quando comparado com os demais filmes. Em geral, filmes elaborados a partir de proteínas miofibrilares de peixe tendem a apresentar maior afinidade com a água devido a característica hidrofílica apresentada por suas proteínas (ARAÚJO, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), aumentando assim sua permeabilidade e solubilidade, o que pode ser observado também na solubilidade das bicamadas P+G e P+Z. Os filmes e bicamadas de glúten apresentaram menor solubilidade quando comparados com os demais (Tabela 3). Kumari et al. (2017) obtiveram valores de solubilidade bem mais elevados (45,9 %) ao avaliar a solubilidade de filmes de glúten de trigo. O glúten de trigo apresenta em sua composição diferentes aminoácidos apolares, atribuindo a este, menor afinidade com a água e conseqüentemente menores valores nessas determinações (SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2015).

De acordo com Whodo e Moraru (2013) as perdas significativas da qualidade alimentar, podem ocorrer devido a transferência de umidade, gases, aroma, sabor e cor para o ambiente circundante, assim, a permeabilidade ao vapor d'água é um fator de grande importância para destinar o uso adequado de filmes biodegradáveis como embalagens de alimentos. Os filmes de glúten e de pescada apresentaram os menores valores de permeabilidade.

Segundo Tongnuanchan et al. (2011), a presença de lipídios nos filmes pode interferir na reticulação das proteínas na rede filmogênica, assim, a elevada concentração de

azeite de oliva utilizada na elaboração da solução filmogênica de zeína pode ter influenciado para que estes filmes e bicamadas tenham apresentado alta permeabilidade ao vapor d'água.

3.3.3 Propriedades térmicas

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos a partir das análises térmicas realizadas nos filmes e bicamadas poliméricas. Através da calorimetria diferencial de varredura (DSC) podemos determinar a temperatura de transição vítrea (T_g), que também pode ser avaliada na Figura 3, esta é representada por uma mudança muito sutil na linha de base, e ocorre quando há uma variação no calor específico sem mudança significativa da temperatura.

Tabela 4 - Temperatura de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) obtidas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e perda de massa até o ponto de fusão obtida por análise termogravimétrica (TGA) dos filmes e bicamadas.

Filmes	DSC			TGA
	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH (kJ/kg)	Perda de massa (%) até T_m (°C)
FP	105,03	108,19	4,43	9,6
FG	121,59	124,77	12,46	9,0
FZ	119,09	130,70	8,50	6,2
BI Z+P	118,24	122,16	1,85	4,5
BI Z+G	50,58	54,27	0,69	0,1
BI P+G	105,41	117,27	0,76	8,7

FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BI P+Z: bicamada de isolado proteico de pescada e zeína; BI Z+G: bicamada de zeína e glúten; BI P+G: bicamada isolado proteico de pescada e glúten; Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

A bicamada de zeína com glúten (Tabela 4) foi a que apresentou a menor T_g quando comparada com os demais filmes e bicamadas, que apresentaram T_g acima de 100 °C. Ao atingem uma determinada temperatura, essas moléculas conseguem se organizar na forma de cristais, em um arranjo mais estável, absorvendo calor e caracterizando uma reação endotérmica. Ao atingirem a temperatura de fusão ou *melting* (T_m), ocorre um movimento significativo das cadeias moleculares devido a desestruturação dos cristais pelo aumento da temperatura. A essa temperatura, as regiões ordenadas dos polímeros, se desagregam e fundem. Acima dessa temperatura, o polímero está no estado viscoso adequado para moldagem (PAOLI, 2009). A energia (entalpia, ΔH) gasta para a bicamada zeína mais glúten passar da T_g para T_m

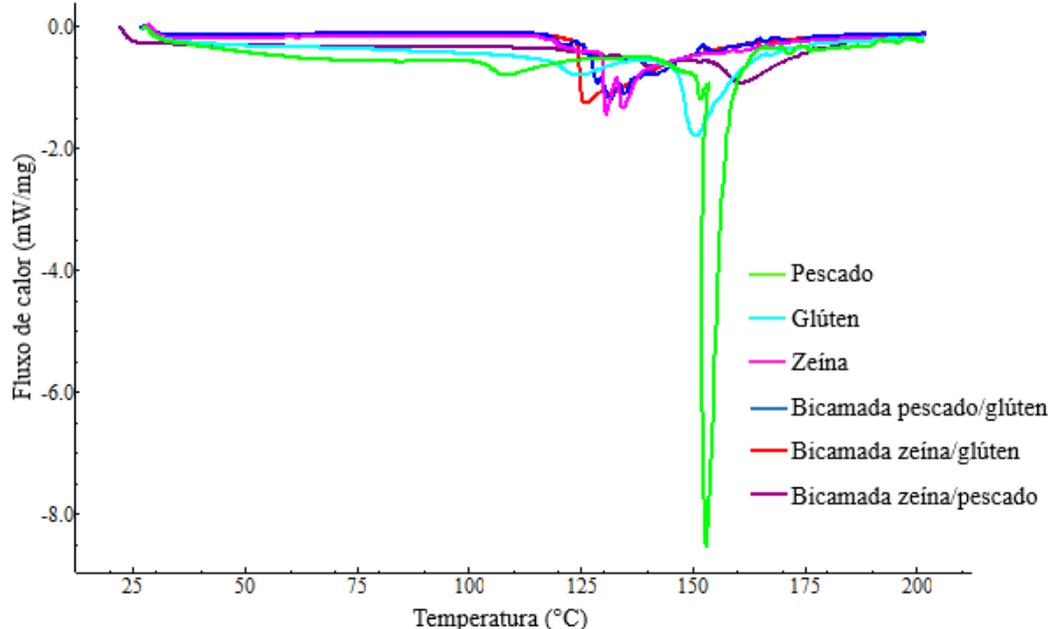
foi baixa, e a perda de massa até a T_m também foi muito pequena quando comparada aos demais filmes.

Todos os filmes avaliados, exceto a BI Z+G, possuem ponto de fusão igual ou maior ao polímero sintético polietileno de baixa densidade (PEBD), entretanto, a energia necessária para que o ponto de fusão do PEBD seja alcançado é muito maior quando comparada com as energias necessárias no presente estudo, indicando uma fraca interação entre os polímeros das matrizes desenvolvidas (MANO, 1999; PAOLI, 2009).

As propriedades mecânicas e de barreira dos polímeros estão relacionadas com a T_g . Dessa forma, o conhecimento da temperatura de transição vítrea dos filmes ajuda na escolha das melhores condições de armazenamento, sendo esperado que a permeação a gases e ao vapor d'água através dos filmes seja maior acima da T_g , onde as cadeias dos polímeros estão em maior movimento (MOTHÉ, 2009).

Os filmes que apresentaram melhores propriedades térmicas foram o FG, o FZ e o BI Z+P. O FP apresentou propriedades mais baixas e quando foi adicionado a camada de zeína formando uma única estrutura, teve essas propriedades melhoradas, mostrando que a bicamada é uma boa alternativa para melhoria das propriedades térmicas desse filme.

Figura 3 - Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo

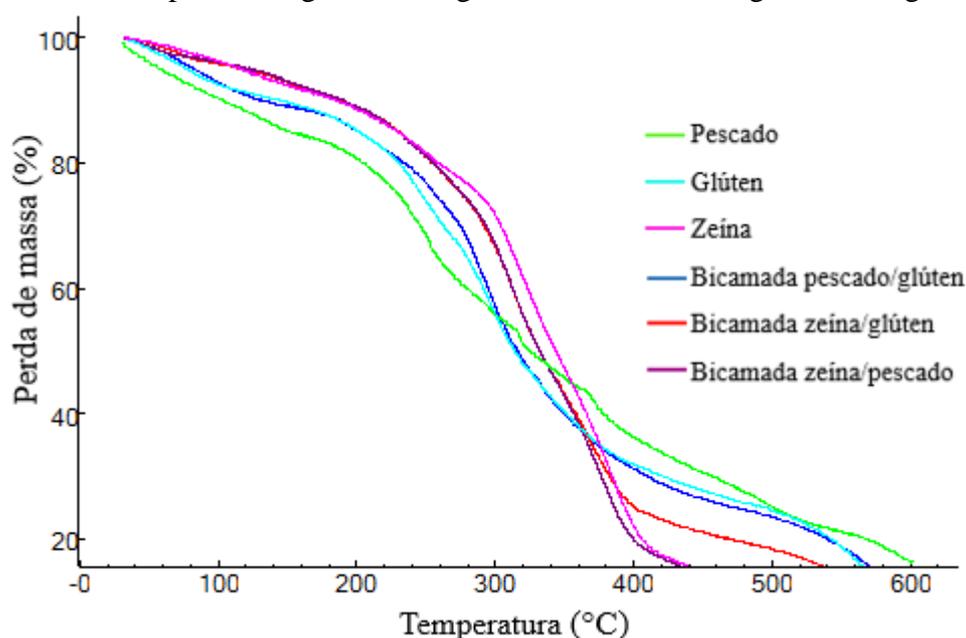


A perda de massa de todos filmes, conforme demonstrado na Figura 4, exceto para a BI Z+G ocorreu em temperaturas acima de 100 °C, indicando que a água presente nas

amostras não estava totalmente ligada para que ocorressem mudanças de estado físico das amostras. Além disso, até a T_m dos filmes, não houve perda de massa maior que 10% das matrizes (Tabela 4).

A TGA foi utilizada em um estudo realizado por Bräuer et al. (2007), para avaliar a decomposição térmica de proteínas vegetais plastificadas. As proteínas plastificadas possuíam uma temperatura de decomposição reduzida, atribuída às menores interações proteína-proteína em filmes proteicos.

Figura 4 - Análise termogravimétrica (TGA) de filmes de pescada, glúten de trigo, zeína, blenda de pescada e glúten de trigo e blenda de zeína e glúten de trigo



Em geral, uma curva de TGA pode ser dividida em quatro partes: (i) eliminação de água; (ii) a decomposição do plastificante; (iii) a quebra de ligações fracas levando à clivagem das ligações peptídicas; e (iv) a clivagem de ligações mais fortes, o que resulta na degradação total do material (MARQUIE, 2001; NANDA; RAO; NAYAK, 2007; SUN; SONG; ZHENG, 2007; SWAIN; RAO; NAYAK, 2004).

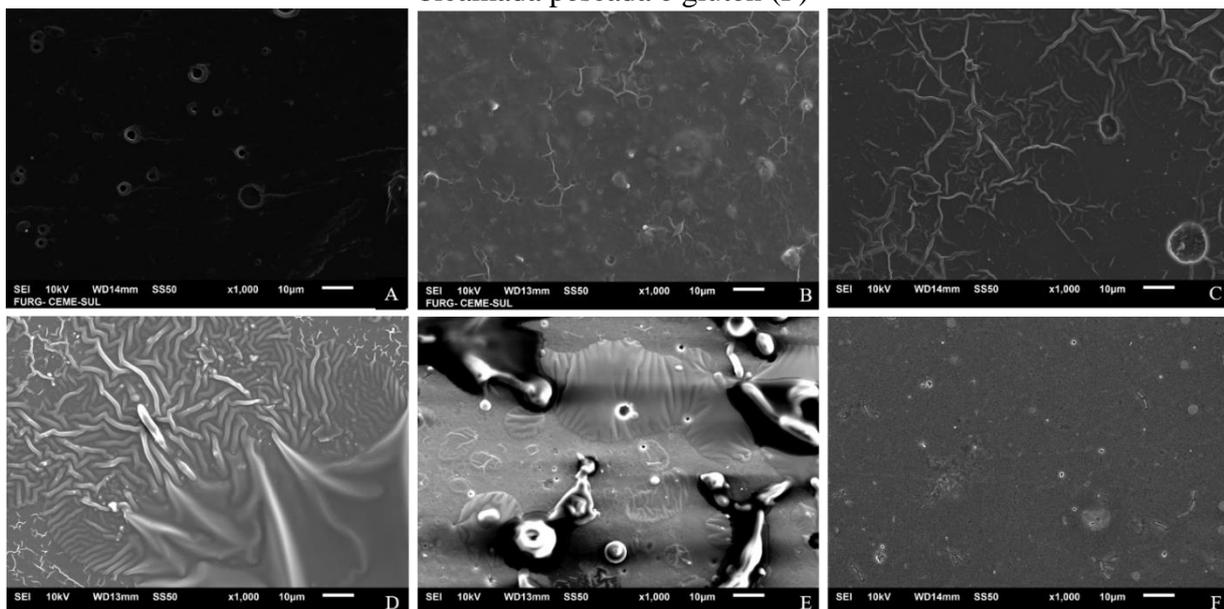
3.3.4 Propriedades microestruturais

As Figuras 5 e 6 apresentam as eletromicrografias superficiais (Figura 5) e laterais (Figura 6) dos filmes individuais e bicamadas. Observando a Figura 5 é possível observar que os filmes individuais e bicamadas apresentam superfície irregular com poros e ranhuras. Nas Figuras 5 E, 6 C, 6 D e 6 E ainda é possível observar a imagem de gotículas de gordura por

meio da presença de estruturas arredondadas. De acordo com Souza (2011) as superfícies irregulares de filmes crescidos de óleo ocorrem devido à separação das fases ou maior tensão de superfície, resultando em maiores descontinuidades nas estruturas dos filmes e, possivelmente proporcionando a formação de caminhos preferencias para a difusão de vapor de água, aumento da permeabilidade ao vapor de água nesses filmes. Esta observação também foi relatada para biofilmes de zeína elaborados por diversos autores (ALMEIDA, 2010; ANSORENA; ZUBELDIA; MARCOVICH, 2016; DONG; SUN; WANG, 2004; GHANBARZADEH et al., 2008). Estes estudos corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, onde os filmes e bicamadas de zeína, que contém elevada concentração de azeite de oliva apresentaram altas taxas de permeabilidade ao vapor d'água.

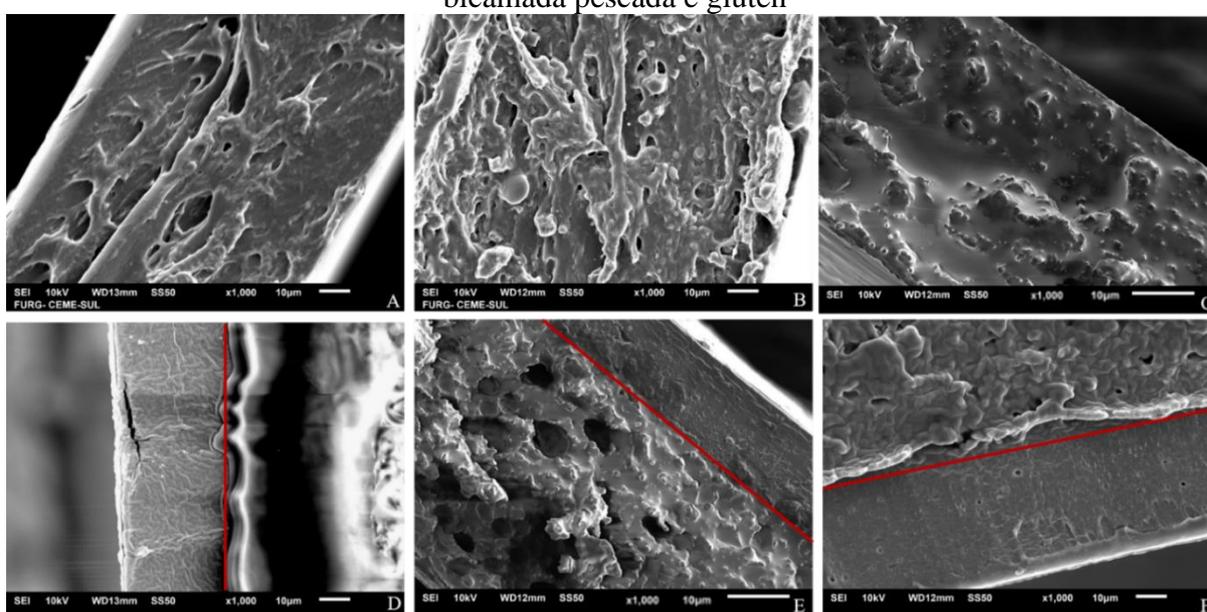
Nas eletromicrografias laterais exibidas na Figura 6, é possível observar a estrutura interna dos filmes e bicamadas. Todos os filmes apresentaram micro poros ou cavidades em suas estruturas, e na Figura 6 C é possível visualizar os glóbulos de gordura presentes no filme de zeína. Esses glóbulos de gordura dispersos indicam que não houve boa interação entre os lipídios e os demais componentes do filme, fazendo com isso afetasse negativamente o alongamento na ruptura e a permeabilidade ao vapor d'água do filme e bicamadas contidas de zeína (Tabela 3).

Figura 5- Microscopia eletrônica de varredura superficial de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C), bicamada de pescada e zeína (D), bicamada de zeína e glúten (E) e bicamada pescada e glúten (F)



Nas eletromicrografias laterais das bicamadas apresentadas nas Figuras 6 C, 6 D e 6 E, observa-se a diferença nas espessuras das camadas dos filmes. Essas diferenças podem ocorrer em função das diferentes concentrações proteicas utilizadas, e também, quando ocorre a evaporação da água da solução filmogênica, e as proteínas se realoçam de formas distintas, podendo ocasionar diferentes arranjos com espessuras desiguais, ainda que a quantidade de solução filmogênica adicionada nas placas tenha sido a mesma para todas bicamadas.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura lateral de filmes de pescada (A), glúten de trigo (B), zeína (C), bicamada de pescada e zeína (D), bicamada de zeína e glúten (E) e bicamada pescada e glúten



É importante ressaltar que todas as bicamadas apresentaram união espontânea dos dois filmes, não sendo necessária a adição de nenhum tipo de goma ou cola e nem prensagem para formar uma única estrutura, evitando assim um aumento nos custos para obtenção das mesmas.

3.3.5 Biodegradabilidade dos filmes em solo

A biodegradabilidade dos filmes pode ser observada na Tabela 5. Os filmes de pescada e de glúten de trigo degradaram-se totalmente em até 10 dias. Nos demais filmes é possível notar um aumento progressivo da degradação ao longo do tempo. Com o passar do tempo os filmes foram gradativamente perdendo massa, sendo que, aos 60 dias de análise, somente o filme de zeína não tinha se degradado por completo.

A umidade média do solo durante o período de biodegradação foi de $29,1 \pm 3,2\%$, umidade relativa de $76,2 \pm 2,3\%$ e temperatura média de $19,9 \pm 0,1$ °C. A contagem total estimada de bactérias mesófilas no solo foi de 2×10^4 UFC/mL, enquanto de fungos foi de 3×10^3 UFC/mL.

De acordo com Arancibia et al. (2014), a adição de água periodicamente para que a umidade do solo seja mantida, pode levar a perda de alguns compostos solúveis, incluindo plastificantes, como o glicerol. Ainda de acordo com os autores, a perda de massa dos filmes está relacionada com o grau de reticulação, perda de compostos de baixo peso molecular e atividade microbiana, especialmente por degradação enzimática.

Tabela 5 - Perda de massa dos filmes e blendas durante o período de biodegradação

Amostras	Perda de massa (%)					
	10 dias	20 dias	30 dias	40 dias	50 dias	60 dias
FP	100	100	100	100	100	100
FG	100	100	100	100	100	100
FZ	$42,4 \pm 3,1$	$45,7 \pm 3,1$	$48,5 \pm 3,6$	$55,6 \pm 5,8$	$67,1 \pm 2,5$	$74,5 \pm 7,7$
BI P+Z	$47,3 \pm 3,2$	$53,0 \pm 2,4$	$71,4 \pm 1,1$	100	100	100
BI Z+G	$47,3 \pm 1,6$	$51,3 \pm 4,3$	$67,8 \pm 4,5$	100	100	100
BI P+G	$54,3 \pm 1,1$	$66,1 \pm 1,5$	100	100	100	100

FP: filme de isolado proteico de pescada; FG: filme de glúten de trigo; FZ: filme de zeína de milho; BI P+Z: bicamada de isolado proteico de pescada e zeína; BI Z+G: bicamada de zeína e glúten; BI P+G: bicamada isolado proteico de pescada e glúten.

4 CONCLUSÃO

Foi possível elaborar filmes individuais e bicamadas a partir das proteínas de pescada, glúten de trigo e zeína de milho. Nas bicamadas produzidas não foi necessário utilizar nenhum tipo de adesivo, cola ou qualquer outro produto para que os mesmos formassem uma estrutura única. A partir da caracterização realizada, é possível afirmar que a bicamada que apresentou melhores propriedades, quando comparada as demais foi a bicamada de pescada com glúten, entretanto, mais estudos devem ser realizados para que as propriedades de barreira e solubilidade dessa bicamada sejam melhoradas. Os resultados de biodegradabilidade dos filmes foram bastante satisfatórios, uma vez que após 60 dias de análise, somente o filme de zeína não se degradou totalmente, com apenas 25,5 % de massa restante a se degradar. Acredita-se que a BI P+G seja a mais indicada para o desenvolvimento de materiais de embalagem para

alimentos, devido as suas propriedades mecânicas, óticas e estruturais terem sido melhores quando comparadas aos demais filmes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. B. de. **Características estruturais e funcionais de biofilmes de zeína e óleos vegetais comestíveis**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2010.

ANSORENA, M. R.; ZUBELDÍA, F.; MARCOVICH, N. E. Active wheat gluten films obtained by thermoplastic processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 47-54, 2016.

AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C, 2000.

ARANCIBIA, M. Y.; LOPEZ-CABALLERO, E.; GÓMEZ-GUILLEN, M. C.; MONTERO, P. Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. **Food Control**, v. 44, p. 7-15, 2014.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 5. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

ARFAT Y.A.; BENJAKUL S.; PRONDPRAN T.; OSAKO, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 58–67, 2014.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-00. In: **Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2000.

ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-02. In: **Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2002.

BRÄUER, S.; MEISTER, F.; GOTTLÖBER, R. P.; NECHWATAL, A. Preparation and thermoplastic processing of modified plant proteins. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 292, p. 176-183, 2007.

CINELLI, P.; SCHMID, M.; BUGNICOURT, E.; WILDNER, J.; BAZZICHI, A.; ANGUILLES, I.; LAZZERI, A. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 151–157, 2014.

CHO, S. Y.; LEE, S. Y.; RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1234–1239, 2010.

DICK, M. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir da semente e da mucilagem de Chia (*Salvia hispanica* L.)**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre. Artmed Editora, 2010.

DONG, J.; SUN, Q. S.; WANG, J. Y. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. **Biomaterials**, Surrey, v. 25, n. 1-28, p. 4691-4697, 2004.

FERREIRA, S. P.; RUIZ, W. A.; GASPAR-CUNHA, A. Influência da temperatura de extrusão nas propriedades reológicas do bioplástico de glúten de trigo. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)**, v. 37, n. 1, p. 10–19, 2014.

FREITAS, I.R.; GAUTÉRIO, G. V.; RIOS, D. G.; PRENTICE, C. Functionality of protein isolates from argentine anchovy (*engraulis anchoita*) residue obtained using ph shift processing. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 1, n. 5, p. 374-378, 2011.

GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1835-1839, 1993.

GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 2, p. 209–215, 2008.

GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 517–524, 2009.

GHERARDI, R.; BECERRIL, R.; NERIN, C.; BOSETTI, O. Development of a multilayer antimicrobial packaging material for tomato puree using an innovative technology. **LWT – Food Science and Technology**, v. 72, p. 361-367, 2016.

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

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water-vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal Food Science**. v. 58 n. 1, p. 206–211, 1993.

GONZÁLEZ, A.; IGARZABAL, C. I. Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 289–296, 2013.

HAGER, ANNA-SOPHIE.; VALLONS, K. J. R.; ARENDT, E. K. Influence of gallic acid and tannic acid on the mechanical and barrier properties of wheat gluten films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6157–6163, 2012.

- KUMARI, M.; MAHAJAN, H.; JOSHI, R.; GUPTA, M. Development and structural characterization of edible films for improving fruit quality. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 12, p. 42–50, 2017.
- YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 81-92, 2003.
- LEMPEK, T. S.; PRENTICE, C.; LOPES, M. L. Efeito do vácuo na qualidade da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*). **Revista Brasileira de Agrociência**. v.7, n.1, p. 64-67, 2001.
- MANO, E. B. **Introdução a polímeros**. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.
- MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starchburied under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 20– 28, 2014.
- MARQUIE, C. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4676-4681, 2001.
- MASTROMATTEO, M.; SHILLO, S.; BUONOCORE, G. G.; MASSARO, A.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Effects of spelt and wheat bran on the performances of wheat gluten films. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 2, p. 202–212, 2008.
- MELLINAS, C.; VALDES, A.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; GARRIGÓS, M. del C.; JIMENEZ, A. Active edible films: Current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, p.1-15, 2016.
- MOTHÉ, C. G. **Análise térmica de materiais**. São Paulo: Artliber, 2009.
- NIE, X.; GONG, Y.; WANG, N.; MENG, X. Preparation and characterization of edible myofibrillar protein-based film incorporated with grape seed procyanidins and green tea polyphenol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1042–1046, 2015.
- NANDA, P. K.; RAO, K. K.; NAYAK, P. L. Thermal degradation analysis of biodegradable plastics from urea-modified soy protein isolate, **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 46, p. 207-211, 2007.
- PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2009. 286 p.
- PENA-SERNA, C.; LOPES-FILHO, J. F. Biodegradable zein-based blend films: structural, mechanical and barrier properties. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 348–353, 2015.
- PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 439-449, 2013.

ROCHA, M.D., LOIKO, M.R., GAUTÉRIO, G.V., TONDO, E.C., PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666–673, 2013.

ROMANI, V. P. **Desenvolvimento de embalagem ativa utilizando matérias-primas renováveis**. 2015. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities – An overview. **Journal of Cereal Science**, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Livraria Varela Ltda. São Paulo, SP, 1997.

SOUZA, V. C. **Produção de filmes biopoliméricos a partir de quitosana com incorporação de fração lipídica**. 2011. 97p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SUN, S.; SONG, Y.; ZHENG, Q. Morphologies and properties of thermo-molded biodegradable plastics based on glycerol-plasticized wheat gluten. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1005-1013, 2007.

SWAIN, S. N.; RAO, K. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable polymers. III. Spectral, thermal, mechanical, and morphological properties of cross-linked furfural-soy protein concentrate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, p. 2590-2596, 2004.

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

WIHODO, M.; MORARU, C.I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 292–302, 2013.

ZAVAREZE, E. R.; EL HALAL, S. L. M.; SILVA, R. M.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Mechanical, barrier and morphological properties of biodegradable films based on muscle and waste proteins from the Whitemouth Croaker (*Micropogonias Furnieri*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1-9, 2013.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSÃO GERAL

A utilização de proteínas de pescada, glúten e zeína demonstraram ser promissoras na obtenção de filmes e blendas para desenvolvimento de embalagens biodegradáveis de alimentos. As proteínas foram capazes de originar filmes com diferentes características, podendo estes serem direcionados para diversas aplicações.

As proteínas de pescada originaram filmes mais resistentes e solúveis em água, enquanto que os filmes de glúten apresentaram maior alongamento na ruptura e menor solubilidade, mostrando serem os mais promissores no desenvolvimento de materiais de embalagem. Os filmes de zeína apresentaram baixas propriedades mecânicas e alta solubilidade. Com o desenvolvimento das blendas observou-se que estas apresentaram propriedades intermediárias quando comparados aos componentes utilizados em separado, evidenciando a combinação das características das diferentes matérias-primas utilizadas. Dentre as blendas elaboradas, aquela produzida com proteínas de pescada e glúten mostrou ser a mais adequada para aplicações em alimentos devido as melhores propriedades apresentadas quando comparadas com os demais filmes elaborados.

Nas bicamadas produzidas não foi necessário utilizar nenhum tipo de adesivo, cola ou qualquer outro produto para que os mesmos formassem uma estrutura única. A partir da caracterização realizada, é possível afirmar que a bicamada que apresentou melhores propriedades, quando comparada as demais foi a bicamada de pescada com glúten.

Os resultados de biodegradabilidade dos filmes foram bastante satisfatórios. A perda de massa dos filmes ocorreu de forma crescente com o passar do tempo. Os filmes de proteína de pescada e de glúten degradaram-se em menos de 10 dias, enquanto, após 60 dias de análise, somente o filme de zeína não se degradou totalmente, com apenas 25,5 % de massa restante a se degradar.

Comparando os melhores resultados obtidos nos dois artigos, é possível dizer que a blenda de pescado com glúten foi a que apresentou melhores resultados, se sobressaindo e tendo maiores possibilidades de aplicação como embalagens de alimentos com baixa ou média atividade de água.

As proteínas de pescada e de glúten de trigo apresentaram-se promissoras para o desenvolvimento de filmes, blendas e bicamadas com boas propriedades, podendo ser utilizadas em diferentes aplicações. Mais estudos afim de melhorar as propriedades dos filmes desenvolvidos a partir dessas proteínas seria de grande interesse para aumentar suas possibilidades de aplicação.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, J.; TIWARI, B. K.; IMAM, S. H; RAO, M. A. **Starch-Based Polymeric Materials and Nanocomposites: Chemistry, Processing, and Applications**. USA: CRC Press, 2012.

ALMEIDA, C. B. de. **Características estruturais e funcionais de biofilmes de zeína e óleos vegetais comestíveis**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2010.

AL-SAIDI, L. F.; MORTENSEN, K.; ALMDAL, K. Environmental stress cracking resistance. Behaviour of polycarbonate in different chemicals by determination of the time dependence of stress at constant strains. **Polymer Degradation and Stability**, v. 82, p. 451-461, 2003.

ANSORENA, M. R.; ZUBELDÍA, F.; MARCOVICH, N. E. Active wheat gluten films obtained by thermoplastic processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 47-54, 2016.

AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, D.C, 2000.

AQUINO, V. C. de. **Estudo da estrutura de massas de pães elaboradas a partir de diferentes processos fermentativos**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ARANCIBIA, M. Y.; LOPEZ-CABALLERO, E.; GÓMEZ-GUILLEN, M. C.; MONTERO, P. Release of volatile compounds and biodegradability of active soy protein lignin blend films with added citronella essential oil. **Food Control**, v. 44, p. 7-15, 2014.

ARANCIBIA, M.; GIMENEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. F.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 989–995, 2014.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 5. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

ARFAT Y.A.; BENJAKUL S.; PRONDPRAN T.; OSAKO, K. Development and characterisation of blend films based on fish protein isolate and fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 58–67, 2014.

ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-02. In: **Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2002.

ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-00. In: **Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, 2000.

ASTM. **Standards pertaining to the biodegradability and compostability of plastics D20-96**, Philadelphia, 1999.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and orégano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, (Online), 2011.

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais polimericos bioativos a base de gelatina e própolis**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V.; YAMASHITA, F. Hidrofilicidade de filmes de amido/poli (butileno adipato co-teraftalato) (pbat) adicionados de tween 80 e óleo de soja. **Polímeros**, São Carlos, v. 23, n. 2, p. 270-275, 2013.

BRÄUER, S.; MEISTER, F.; GOTTLÖBER, R. P.; NECHWATAL, A. Preparation and CAMPBELL, M. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CENTENARO, G. S.; FEDDERN, V.; BONOW, E. T.; SALAS-MELLADO, M. Enriquecimento de pão com proteínas de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 663–668, 2007.

CENTENARO, G. S.; MELLADO, M. S. Influência das concentrações de enzima e de substrato no grau de hidrólise e no conteúdo proteico de hidrolisados enzimáticos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Boletim do CEPPA**, v. 26, p. 61-70, 2008.

CHEN, Y.; YE, R.; LIU, J. Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 140– 147, 2014.

CHINMA, C. E.; ARIAHU, C. C.; ABU, J. O. Development and characterization of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 383-389, 2012.

CHO, S. Y.; LEE, S. Y.; RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1234–1239, 2010.

CINELLI, P.; SCHMID, M.; BUGNICOURT, E.; WILDNER, J.; BAZZICHI, A.; ANGUILLES, I.; LAZZERI, A. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 151–157, 2014.

CONDÉS, M. C.; ANÓN, M. C.; MAURI, A. N.; DUFRESNE, A. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 146–157, 2015.

CORTES, M. S. 2015. **Características estruturais e físicas de material biodegradável produzido a base de zeína e fibras de milho e bananeira**. 99f. Tese (Doutorado em

Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

CORTEZ-VEGA, W. R.; BAGATINI, D. C.; SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Biofilmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e montmorilonita: avaliação das propriedades físicas, mecânicas e de barreira. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 90-98, 2013.

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**, v. 45, n. 3, p. 622-626, 1997.

DALEV, P. G.; PATIL, R. D.; MARK, J. E.; VASSILEVA, E.; FAKIROV, S. Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 78, p. 1341–1347, 2000.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre. Artmed Editora, 2010.

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

PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2009. 286 p.

DICK, M. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir da semente e da mucilagem de Chia (*Salvia hispanica* L.)**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DOMB, A. J.; KOST, J.; WISEMAN, D. M. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. 544 p.

DONG, J.; SUN, Q. S.; WANG, J. Y. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. **Biomaterials**, Surrey, v. 25, n. 1-28, p. 4691-4697, 2004.

EGGINS, H. O. W.; OXLEY, T. A. Biodeterioration and biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 48, p. 12–15, 2001.

FABRA, M. J.; BUSOLO, M. A.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Nanostructured biolayers in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 1, p. 79–87, 2013.

FABRIS, S.; FREIRE, M. T. D. A.; REYES, F. G. R. Nação de alimentos e aspectos de legislação. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 2, n. 19, p. 59–70, 2006.

FAKHOURI, F. M. **Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina**. 2009. 249 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

- FERREIRA, S. P.; RUIZ, W. A.; GASPAR-CUNHA, A. Influência da temperatura de extrusão nas propriedades reológicas do bioplástico de glúten de trigo. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)**, v. 37, n. 1, p. 10–19, 2014.
- FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Obtenção e avaliação de concentrados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*) processados por extração química. **Química Nova**, v. 32, p. 2299-2303, 2009.
- FORATO, L. A.; BRITTO, D. de; SCRAMIN, J. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B. G. Propriedades Mecânicas e Molhabilidade de Filmes de Zeínas Extraídas de Glúten de Milho. **Polímeros**, v. 23, n. 1, p. 42–48, 2013.
- FREITAS, I.R.; GAUTÉRIO, G. V.; RIOS, D. G.; PRENTICE, C. Functionality of protein isolates from argentine anchovy (*engraulis anchoita*) residue obtained using ph shift processing. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 1, n. 5, p. 374-378, 2011.
- GAO, P.; WANG, F.; GU, F.; NING, J.; LIANG, J.; LI, N.; LUDESCHER, R. D. Preparation and characterization of zein thermo-modified starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1254–1260, 2017.
- GARCÍA, F. T.; SOBRAL, P. J. A. Effect of the thermal treatment of the film-forming solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of tilapia. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 289-296, 2005.
- GEHRING, C. K.; GIGLIOTTI, J. C.; MORITZ, J. S.; TOU, J. C.; JACZYNSKI, J. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish e a review. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 422-431, 2011.
- GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1835-1839, 1993.
- GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 2, p. 209–215, 2008.
- GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 517–524, 2009.
- GHERARDI, R.; BECERRIL, R.; NERIN, C.; BOSETTI, O. Development of a multilayer antimicrobial packaging material for tomato puree using an innovative technology. **LWT – Food Science and Technology**, v. 72, p. 361-367, 2016.
- GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science Technology**, v. 29, p. 39–50, 1994.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water-vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal Food Science**. v. 58 n. 1, p. 206–211, 1993.

- GONZÁLEZ, A.; IGARZABAL, C. I. Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 289–296, 2013.
- GONZÁLEZ, A.; STRUMIA, M. C.; IGARZABAL, C. I. A. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. **Journal of Food Engineering**, v. 106, n. 4, p. 331–338, 2011.
- GUERRERO, P.; GARRIDO, T.; LECETA, I.; CABA, K. Films based on proteins and polysaccharides: Preparation and physical–chemical characterization. **European Polymer Journal**, v. 49, p. 3713-3721, 2013.
- HAGER, ANNA-SOPHIE.; VALLONS, K. J. R.; ARENDT, E. K. Influence of gallic acid and tannic acid on the mechanical and barrier properties of wheat gluten films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6157–6163, 2012.
- HALLAL, L. M. E. Desenvolvimento e caracterização de filmes a base de isolado proteico de resíduos de corvna (*Micropogonias furnieri*) e óleo de palma. 2012. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.
- HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 30–39, 2008.
- HULTIN, H. O.; KELLEHER, S. D. **High efficiency alkaline protein extraction** United States, 2000.
- IBGE, 2017. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Indicadores da produção agrícola**. Fevereiro, 2017. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201702.pdf. Acesso em: 30 de jun. 2017, 00:29:30.
- ISHIAKU, U. S.; PANG, K. W.; LEE, W. S.; ISHAK, Z. A. M. Mechanical properties and enzymic degradation of thermoplastic and granular sago starch filled poly (ϵ -caprolactone). **European Polymer Journal**, v. 38, p. 393-401, 2002.
- JACOB, R. F. **Estudo das propriedades das blendas de amido termoplástico e látex natural**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências - Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- KALE, G.; KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; SELKE, S. E.; SINGH, S. P. Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 255-277, 2007.
- KHOSRAVI, S.; NORDQVIST, P.; KHABBAZ, F.; ÖHMAN, C.; BJURHAGER, I.; JOHANSSON, M. Wetting and film formation of wheat gluten dispersions applied to wood substrates as particle board adhesives. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 476–482, 2015.

- KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; LENART, A.; VOILLEY, A. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, v. 20, 53–60, 2010.
- KRISTINSSON, H. G.; HULTIN, H. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.17, p.5103-5110, 2003.
- KRISTINSSON, H. G.; LIANG, Y. Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.304–312, 2006.
- KUMARI, M.; MAHAJAN, H.; JOSHI, R.; GUPTA, M. Development and structural characterization of edible films for improving fruit quality. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 12, p. 42–50, 2017.
- KUREK, M.; GALUS, S.; DEBEAUFORT, F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 1, n. 1, p. 56–67, 2014.
- LAWTON, J.W. Zein: a history of processing and use. Review. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 1-18, 2002.
- LEMPEK, T. S.; MARTINS, V. G.; PRENTICE, C. Rheology of surimi-based products from fatty fish underutilized by the industry. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 24, n. 16, p.27-44, 2007.
- LEMPEK, T. S.; PRENTICE, C.; LOPES, M. L. Efeito do vácuo na qualidade da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*). **Revista Brasileira de Agrociência**. v.7, n.1, p. 64-67, 2001.
- LIANG, J. XIA, Q.; WANG, S.; LI, J.; HUANG, Q.; LUDESCHER, R. D. Influence of glycerol on the molecular mobility, oxygen permeability and microstructure of amorphous zein films. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 94–100, 2015.
- LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVASAUCEDO, J. E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. **Chemosphere**, v. 73, p. 429-442, 2008.
- LUCKACHAN, G, E.; PILLAI, C.K.S. Biodegradable polymers- A review on recent trends and emerging perspectives. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, p. 637–676, 2011.
- MANO, E. B. **Introdução a polímeros**. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.
- MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starchburied under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 20– 28, 2014.

MARMON, S. K.; UNDELAND, I. Effect of alkaline pH-shift processing on *in vitro* gastrointestinal digestion of herring (*Clupea harengus*) fillets. **Food Chemistry**, v.138, n.1, p.214-219, 2013.

MARQUIE, C. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4676-4681, 2001.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado proteico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, p. 61-66, 2009.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 377–383, 2010.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R.A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatina. under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 1307–1313, 2009.

MASTROMATTEO, M.; SHILLO, S.; BUONOCORE, G. G.; MASSARO, A.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Effects of spelt and wheat bran on the performances of wheat gluten films. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 2, p. 202–212, 2008.

MATAK, K. E.; TAHERGORABI, R.; JACZYNSKI, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. **Food Research International**, 2015.

MELLINAS, C.; VALDES, A.; RAMOS, M.; BURGOS, N.; GARRIGÓS, M. del C.; JIMENEZ, A. Active edible films: Current state and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, p.1-15, 2016.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 179–189, 2000.

MOTHÉ, C. G. **Análise térmica de materiais**. São Paulo: Artliber, 2009.

NANDA, P. K.; RAO, K. K.; NAYAK, P. L. Thermal degradation analysis of biodegradable thermoplastic processing of modified plant proteins. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 46, p. 207-211, 2007.

NIE, X.; GONG, Y.; WANG, N.; MENG, X. Preparation and characterization of edible myofibrillar protein-based film incorporated with grape seed procyanidins and green tea polyphenol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1042–1046, 2015.

NOLSOE, H.; UNDELAND, I. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. **Food Bioprocess and Technology**, v. 2, p. 1-27, 2009.

NORDQVIST, P.; KHABBAZ, F.; MALMSTRÖM, E. Comparing bond strength and water resistance of alkali-modified soy protein isolate and wheat gluten adhesives. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 30, n. 2, p. 72–79, 2010.

OKAMOTO, S. Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**. v. 23, p. 256–262, 1978.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: ARTMED, 2005.

OZCALIK, O.; TIHMINLIOGLU, F. Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 4, p. 505–513, 2013.

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. 2003. 185 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2009. 286 p.

PAPALIA, I. da S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 2, p. 552–559, 2015.

PASTOR C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L.; CHÁFER M.; CHIRALT M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1174–1183, 2010.

PENA-SERNA, C.; LOPES-FILHO, J. F. Biodegradable zein-based blend films: structural, mechanical and barrier properties. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 348–353, 2015.

PIOTROWICZ, I. B. **Hidrolisados protéicos de anchoita (*Engraulis anchoita*): obtenção, atividade antioxidante e aplicação em embutido emulsionado**. 2012, 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

PIYADA, K.; WARANYOU, S.; THAWIEN, W. Mechanical, thermal and structural properties of rice starch films reinforced with rice starch nanocrystals. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 439–449, 2013.

PIZZOLI, A. P. de O. **Produção e caracterização de laminados biodegradáveis e antimicrobianos para embalagens de alimentos**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

PLÁCIDO, G. R. **Extração, caracterização e uso da queratina de penas de frango para a obtenção de filmes biodegradáveis**. 2007. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

POOLE, A. J.; CHURCH, J. S. The effects of physical and chemical treatments on Na₂S produced feather keratin films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 99–108, 2015.

RAHAMAN, T.; VASILJEVIC, T.; RAMCHANDRAN, L. Shear, heat and pH induced conformational changes of wheat gluten – Impact on antigenicity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 180–188, 2016.

RAI, A. K.; SWAPNA, H. C.; BHASKAR, N.; HALAMI, P. M.; SACHINDRA, N. M.; Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 9–13, 2010.

REDDY, N.; CHEN, L.; YANG, Y. Biothermoplastics from hydrolyzed and citric acid crosslinked chicken feathers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1203–1208, 2013.

REDDY, N.; HU, C.; YAN, K.; YANG, Y. Thermoplastic films from cyanoethylated chicken feathers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 8, p. 1706–1710, 2011.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629-1652, 2013.

RIBEIRO, W. X. **Caracterização de biofilme a base de zeína e ácido oleico adicionada de nanocarbonato**. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

RIBEIRO, W. X.; LOPES-FILHO, F. F.; CORTES, M. S. Characterization of biodegradable film based on zein and oleic acid added with nanocarbonate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 10, p. 1890-1894, 2015.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 531–539, 2009.

ROCHA, M.D., LOIKO, M.R., GAUTÉRIO, G.V., TONDO, E.C., PRENTICE, C. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 666–673, 2013.

RODRIGUES, D. C. **Influência de amido de mandioca e cera de carnaúba sobre as propriedades físicas de filme à base de goma de cajueiro**. 2012. 89 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ROMANI, V. P. **Desenvolvimento de embalagem ativa utilizando matérias-primas renováveis**. 2015. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

ROMANI, V. P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MARTINS, V. G. Active and sustainable materials from rice starch, fish protein and oregano essential oil for food packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 268–274, 2017.

- SAKANAKA, L. S. **Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA)**. 2007. 108 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007. 21, p. 1005-1013, 2007.
- SALGADO, R. A. F. **Caracterização e recuperação de proteínas de subprodutos de pescado**. 2015. 78 f. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.
- SANCHEZ-GARCIA, M. D.; HILLIOU L.; LAGARON J. M. Nanobiocomposites of carrageenan, zein, and mica of interest in food packaging and coating applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6884–6894, 2010.
- SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities – An overview. **Journal of Cereal Science**, 2015.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Livraria Varela Ltda. São Paulo, SP, 1997.
- SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends Food Science. & Technology**, v. 19, p. 634-643, 2008.
- SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. Mechanical, water vapour barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 423–432, 2001.
- SOUZA, V. C. **Produção de filmes biopoliméricos a partir de quitosana com incorporação de fração lipídica**. 2011. 97p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- SUN, S.; SONG, Y.; ZHENG, Q. Morphologies and properties of thermo-molded biodegradable plastics based on glycerol-plasticized wheat gluten. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1005-1013, 2007.
- SUN, Q.; SUN, C.; XIONG, L. Mechanical, barrier and morphological properties of pea starch and peanut protein isolate blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 630-637, 2013.
- SWAIN, S. N.; RAO, K. K.; NAYAK, P. L. Biodegradable polymers. III. Spectral, thermal, mechanical, and morphological properties of cross-linked furfural-soy protein concentrate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, p. 2590-2596, 2004.
- TADPITCHAYANGKON, P.; PARK, J. W.; MAYER, S. G.; YONGSAWATDIGUL, J. Structural changes and dynamic rheological properties of sarcoplasmic proteins subjected to ph-shift method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4241–4249, 2010.

- TASKAYA, L.; JACZYNSKI J. Flocculation enhanced protein recovery from fish processing by products by isoelectric solubilization/precipitation. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 570-575, 2009.
- TAVARES, L. L.; ALMEIDA, C. B. de; CARUSO, Í. P.; CORNÉLIO, M. L.; LOPES FILHO, J. F. Effect of modified clays on the structure and functional properties of biofilms produced with zein. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.32, n.2, p.314-322, 2012.
- TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, İ. D.; ÖZEN, B. Effect of corn-zein coating on the mechanical properties of polypropylene packaging films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 235–241, 2011.
- TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, I. D.; OZEN, B. Water vapor and oxygen-barrier performance of corn–zein coated polypropylene films. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 342–347, 2010.
- TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; SONGTIPY, P. Characteristics of film based on protein isolate from red tilapia muscle with negligible yellow discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 758–767, 2011.
- TÜRE, H.; GÄLLSTEDT, M.; JOHANSSON, E.; HEDENQVIST, M. S. Wheat gluten/montmorillonite clay multilayer-coated paperboards with high barrier properties. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 1–6, 2013.
- UTRACKI, L. A. **Polymer and blends: thermodynamics and rheology**. New York: Hanser Publishers, 1989.
- VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 62f. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo. 2003.
- WALSH, J. H. Ecological considerations of biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 48, p. 16–25, 2001.
- WANG, L.-F.; RHIM, J.-W. Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 460–468, 2015.
- WANG, Y. X.; CAO, X. J. Extracting keratin from chicken feathers by using a hydrophobic ionic liquid. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 896–899, 2012.
- WIHODO, M.; MORARU, C.I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films. **Journal of Food Engineering**, v.114, p. 292–302, 2013.
- WILHELM, H.-M.; SIERAKOWSKI, M. R.; SOUZA, G. P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 101-110, 2003.

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

XIE, L.; HETTIARACHCHY, N. S.; JU, Z. Y.; MEULLENET, J.; WANG, H.; SLAVIK, M. F.; JANES, M. E. Edible film coating to minimize eggshell breakage and reduce post wash bacterial contamination measured by dye penetration in eggs. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 280-284, 2002.

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

YONG, Z.; LILI, C.; XIAOXIA, CHE.; HENG, Z.; NIANQIU, S.; CHUNLEI, L.; YANA, C.; WEI, K. Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. **Journal of Controlled Release**, v. 206, p. 206–219, 2015.

ZAVAREZE, E. R.; EL HALAL, S. L. M.; SILVA, R. M.; DIAS, A. R. G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Mechanical, barrier and morphological properties of biodegradable films based on muscle and waste proteins from the Whitemouth Croaker (*Micropogonias Furnieri*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1-9, 2013.

ZOLFI, M.; KHODAIYAN, F.; MOUSAVI, M.; HASHEMI, M. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran–whey protein by nanoparticle incorporation. **Carbohydrate Polymers**, v. 109, p. 118–125, 2014.

ZUBELDÍA, F.; ANSORENA, M. R.; MARCOVICH, N. E. Wheat gluten films obtained by compression molding. **Polymer Testing**, v. 43, p. 68–77, 2015.

ZUO, M.; SONG, Y.; ZHENG, Q. Preparation and properties of wheat gluten/methylcellulose binary blend film casting from aqueous ammonia: A comparison with compression molded composites. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 415-422, 2009.