

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biodiversidade

Desenvolvimento e caracterização de filmes biopoliméricos a partir de  
resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de óleos  
essenciais, nanoargila e gelatina

Cintia Granzotti da Silva Scudeler

Dourados-MS  
Dezembro/2019

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biodiversidade

Cintia Granzotti da Silva Scudeler

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES  
BIOPOLIMÉRICOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*) COM INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS, NANOARGILA E GELATINA

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE.  
Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientador: Gustavo Graciano Fonseca  
Co-orientador: William Renzo Cortez-Vega

Dourados-MS  
Dezembro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S436d Scudeler, Cintia Granzotti Da Silva

Desenvolvimento e caracterização de filmes biopoliméricos a partir de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de óleos essenciais, nanoargila e gelatina [recurso eletrônico] / Cintia Granzotti Da Silva Scudeler, Gustavo Graciano Fonseca, William Renzo Cortez-Vega. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Gustavo Graciano Fonseca.

Coorientador: William Renzo Cortez-Vega.

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. isolado proteico. 2. tilápia. 3. pescado. I. Graciano Fonseca, Gustavo. II. Renzo Cortez-Vega, William. III. Fonseca, Gustavo Graciano. IV. Cortez-vega, William Renzo. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

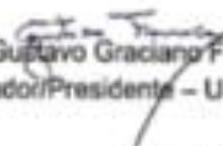
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

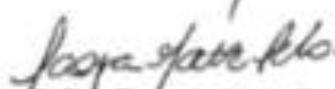
**"DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS A  
PARTIR DE RESÍDUOS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) COM  
INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, NANOARGILA E GELATINA"**

Por

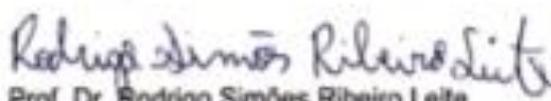
**CINTIA GRANZOTTI DA SILVA SCUDELER**

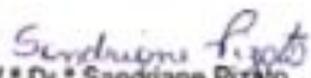
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE  
Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade

  
Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca  
Orientador/Presidente – UFGD

  
Prof. Dr. Farayde Matta Fakhouri  
Membro Titular – UFGD

  
Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz  
Membro Titular – UFGD

  
Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Membro Titular – UFGD

  
Prof. Dr. Sandriane Pizatto  
Membro Titular – UEM

Aprovada em: 25 de outubro de 2019.

*Dedico este trabalho a Deus, meu Senhor, e à minha família pelo carinho, compreensão e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, razão de todas as coisas e luz que nos faz vencer diante dos obstáculos.

Aos meus pais, José Aurélio da Silva e Adélia Granzotti da Silva, meus exemplos de vida e razão por hoje estar aqui.

À Tania Granzotti da Silva, minha irmã, companheira, amiga e quem esteve comigo em todos os momentos deste doutorado.

Ao meu esposo Ronei Peterson e filhos Pedro Henrique e Bruna, pelo apoio, carinho, amizade e principalmente pela compreensão por minha ausência.

A toda minha família, sogra, sogro (*in memorian*), cunhadas e cunhados pelo apoio, incentivo e por todos os momentos de convívio e descontração.

Agradeço a meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pelo privilégio de sua orientação e seus ensinamentos que enriqueceram minha vida.

Aos professores que tanto me ensinaram Prof<sup>o</sup> Dr. William Renzo Cortez-Vega e Prof<sup>a</sup> Dr. Farayde Matta Fakhouri.

Às amigas de laboratório, Raquel Chevalier, Thayná Lima, Carmem Cícera Maria da Silva, Alessandra Oliveira e Rosiane de Souza Silva pelas inúmeras contribuições, pela parceria, pelo companheirismo e por me acolher em todos os momentos.

A todos os anjos que passaram por meu caminho durante todo este período da minha vida.

A todos agradeço profundamente.

MUITO OBRIGADA!!!

## NOMENCLATURA

A.....	Área da secção transversal do filme (m <sup>2</sup> )
AE.....	Área do filme exposta (m <sup>2</sup> )
a*.....	Cromaticidade verde-vermelha
AOAC.....	<i>Official Methods of Analysis</i>
ASTM.....	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP.....	Adenosina trifosfato
b*.....	Cromaticidade azul-amarela
C.....	Continuidade
CaCl <sub>2</sub> .....	Cloreto de cálcio
CEMESUL.....	Centro de Microscopia Eletrônica
CIE.....	Commission Internationale de l'Eclairage
CMS.....	Carne mecanicamente separada
CRA.....	Capacidade de retenção de água (mL de água g proteína <sup>-1</sup> )
CRO.....	Capacidade de retenção de óleo (mL de óleo retido g proteína <sup>-1</sup> )
D65.....	Luz do dia artificial iluminante com temperatura de cor 6500 K
do.....	Separação inicial entre as garras (cm)
dr.....	Separação entre as garras no momento da ruptura (cm)
DRX.....	Difração de raio X
DSC.....	Calorimetria exploratória diferencial
E.....	Elongação (%)
F.....	Teste de Fisher
Fm.....	Força máxima no momento da ruptura (N)
FTIR.....	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
FURG.....	Universidade Federal do Rio Grande
GL.....	Graus de liberdade
GLI.....	Glicerina
H.....	Homogeneidade
HCl.....	Ácido clorídrico
IF.....	Instituto de Física
IP.....	Isolado proteico de CMS de resíduo de tilápia

L.....	Espessura inicial do filme (mm)
L*.....	Luminosidade
m.....	Metros
M.....	Manuseabilidade
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
mf.....	Massa seca final da amostra (g)
mi.....	Massa seca inicial da amostra (g)
M <sub>op</sub> .....	Massa original de proteína
M <sub>p</sub> .....	Massa da proteína
MQ.....	Quadrado médio
MS.....	Mato Grosso do Sul
nm.....	Nanometros
NA.....	Nanoargila
NaCl.....	Cloreto de sódio
Oa.....	Óleo adicionado
OEs.....	Óleos essenciais
OEC.....	Óleo essencial de cravo-da-índia
OEO.....	Óleo essencial de orégano
Onr.....	Óleo não retido
pH.....	Potencial hidrogênico
PVA.....	Permeabilidade ao vapor de água (g mm dia <sup>-1</sup> kPa <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )
Q <sub>ra</sub> .....	Capacidade de água retida
RT.....	Resistência à tração (MPa)
S.....	Solubilidade em água (%)
SA.....	Solubilidade em ácido (%)
SQ.....	Somas dos quadrados
S-S.....	Dissulfeto
t.....	Tempo de armazenamento (dias)
T <sub>f</sub> .....	Temperatura de fusão (°C)
T <sub>g</sub> .....	Temperatura de transição vítrea (°C)
UFGD.....	Universidade Federal da Grande Dourados
UFRGS.....	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UR.....	Umidade relativa (%)
Y.....	Opacidade
Yb.....	Padrão branco
Yp.....	Padrão preto
xxx.....	Excelente
xx.....	Bom
x.....	Deficiente
$\Delta H$ .....	Entalpia de fusão
$\Delta P$ .....	Diferença de pressão parcial (kPa)
$\Delta W$ .....	Ganho de massa pela célula (g)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> Potencial isoelétrico do isolado proteico de tilápia.....	44
<b>Figura 3.2</b> Capacidade de retenção de água do isolado proteico de tilápia em função do pH.....	47
<b>Figura 3.3</b> Filmes biopoliméricos de isolado proteico de tilápia selecionados para caracterização.....	49
<b>Figura 3.4</b> Superfície de resposta da solubilidade em água dos filmes proteicos, em função das concentrações de isolado proteico e nanoargila.....	55
<b>Figura 3.5</b> Superfície de resposta da solubilidade ácida dos filmes proteicos, em função das concentrações de nanoargila e glicerol.....	57
<b>Figura 3.6</b> Superfície de resposta da permeabilidade ao vapor de água dos filmes proteicos de tilápia em função das concentrações de isolado proteico e óleo essencial de cravo-da-índia.....	58
<b>Figura 3.7</b> Superfície de resposta da resistência à tração dos filmes proteicos de tilápia em função das concentrações de isolado proteico e glicerol.....	60
<b>Figura 3.8</b> Superfície de resposta entre os componentes da elongação dos filmes proteicos em função das concentrações de nanoargila e óleo essencial de cravo-da-índia.....	62
<b>Figura 3.9</b> Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície dos nove tratamentos de filme de isolado proteico de tilápia. Ampliação de 1000X .....	64
<b>Figura 3.10</b> Fotomicrografia eletrônica de varredura de filme de isolado proteico de tilápia, mostrando a lateral dos tratamentos T6 e T12 e a superfície do filme nos tratamentos T10 e T16. Ampliação de 2000X.....	65
<b>Figura 3.11</b> Termogramas de DSC dos filmes de isolado proteico de tilápia.....	66
<b>Figura 3.12</b> Difratoograma de filmes de isolado proteico de tilápia.....	68
<b>Figura 3.13</b> Espectro de filme de isolado proteico de tilápia T2 e T16, na faixa de número de onda de 4000 – 750 cm <sup>-1</sup> .....	70
<b>Figura 3.14</b> Atividade antimicrobiana dos filmes biopoliméricos de isolado proteico de tilápia.....	71
<b>Figura 4.1</b> Produção de filme com as diferentes concentrações de isolado proteico e gelatina.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> Matriz de planejamento fatorial, com os valores codificados e reais para o desenvolvimento de filmes à base de isolado de proteína da tilápia do Nilo. ....	37
<b>Tabela 3.2</b> Delineamento fatorial fracionado $2^{(5-1)}$ para produção de filmes.....	38
<b>Tabela 3.3</b> Composição proximal da CMS de tilápia do Nilo.....	45
<b>Tabela 3.4</b> Composição proximal do isolado proteico de CMS de tilápia. ....	46
<b>Tabela 3.5</b> Avaliação subjetiva dos filmes de isolado proteico de tilápia.....	48
<b>Tabela 3.6</b> Caracterização dos filmes de isolado proteico de tilápia.....	50
<b>Tabela 3.7</b> Efeitos estimados de fatores nas respostas experimentais solubilidade em água, solubilidade em ácido, permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongação.....	51
<b>Tabela 3.8</b> Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade em água (S), solubilidade em ácido (SA), permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração (RT) e alongação (E) de filmes de isolado proteico.....	53
<b>Tabela 3.9</b> Resultados de cor dos filmes desenvolvidos a partir de resíduos de tilápia. ....	63
<b>Tabela 4.1</b> Avaliação subjetiva dos filmes de isolado proteico de tilápia.....	86
<b>Tabela 4.2</b> Valores obtidos pelos filmes de isolado proteico de tilápia, correspondente às concentrações de cada experimento, em relação as variáveis dependentes analisadas.....	88

## LISTA DE EQUAÇÕES

$$S (\%) = \frac{Q_{ps}}{Q_{pa}} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

$$CRA = \frac{Q_{ar}}{M_{op}} \quad \text{Equação 3.2}$$

$$CRO = \frac{O_a - O_{nr}}{M_p} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação 3.4}$$

$$S(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação 3.5 (3.10, 3.11)}$$

$$PVA = \frac{\Delta W}{t \times A} \times \frac{L}{\Delta P} \quad \text{Equação 3.6 (3.12)}$$

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad \text{Equação 3.7 (3.13)}$$

$$E = \frac{(d_r - d_o)}{d_o} \times 100 \quad \text{Equação 3.8 (3.14)}$$

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad \text{Equação 3.9}$$

## RESUMO

SCUDELER, Cintia Granzotti da Silva. Universidade Federal da Grande Dourados, outubro de 2019. “**Desenvolvimento e caracterização de filmes biopoliméricos a partir de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de óleos essenciais, nanoargila, gelatina e plastificantes**”. Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Gustavo Graciano Fonseca. Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. William Renzo Cortez-Vega.

Filmes obtidos a partir de fontes renováveis são considerados promissores devido sua capacidade de degradação, diminuindo os impactos ambientais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes à base de isolado proteico de tilápia com adição de diferentes concentrações de glicerol, nanoargila, óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano e filmes à base de isolado proteico de tilápia com diferentes concentrações de gelatina, glicerol e sorbitol; avaliando suas propriedades de espessura, solubilidade em água, solubilidade ácida, permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração, alongação, cor, opacidade, também se avaliou a microestrutura dos filmes obtidos, características térmicas e a atividade antimicrobiana dos filmes com adição de óleos essenciais; comparar as características das formulações. O isolado proteico foi obtido pela técnica de solubilização alcalina da proteína e precipitação no ponto isoelétrico a partir de carne mecanicamente separada de tilápia. Para desenvolver os filmes com nanoargila e óleos essenciais, utilizou-se a técnica de *casting* e planejamento experimental fracionário 2<sup>(5-1)</sup>. Para obtenção dos filmes proteicos com gelatina foi utilizada a mesma técnica com nove experimentos. Para o desenvolvimento dos todos os filmes, a solução filmogênica foi elaborada com 100 mL de água destilada. Para os filmes proteicos com nanoargila, utilizou-se as seguintes concentrações: isolado proteico (0,5; 1,0 e 1,5 g); plastificante glicerol (0,2; 0,3 e 0,4 g); óleo essencial de orégano e de cravo-da-índia (0,0; 0,2 e 0,4 g) e nanoargila (0,1; 0,2 e 0,3 g). Para os filmes com gelatina: isolado proteico (0,0; 0,75; 1,5; 2,25 e 3,0 g); gelatina (3,0; 2,25; 1,5; 0,75 e 0,0 g); sorbitol ou glicerol (0,6; 0,45; 0,3; 0,15 e 0,0 g). A atividade antimicrobiana dos filmes proteicos com nanoargila e óleos essenciais foi verificada através do método de difusão em disco em relação à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados dos filmes proteicos com nanoargila e óleos essenciais foram submetidos à metodologia de superfície de resposta para estudar os efeitos simultâneos das variáveis independentes sobre os parâmetros analisados. O isolado proteico obtido de carne mecanicamente separada de tilápia apresentou 85,15% de proteína, boa capacidade de retenção de água e de óleo. Apresentaram valores de solubilidade em água que variaram de 30,62 a 85,45% e solubilidade em ácido de 13,19 a 45,92%. Os valores obtidos para PVA encontram-se entre 2,38 e 4,02 gmm d<sup>-1</sup>KPa<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>, resistência à tração de 0,65 a 2,76 MPa e para alongação de 0,29 a 2,07%. Para as análises antimicrobianas, os óleos essenciais não apresentaram atividade positiva. Os filmes proteicos com gelatina exibiram valores de solubilidade em água variaram de 4,11 a 28,72%, os valores para PVA variaram de 7,12 a 16,36 gmm d<sup>-1</sup>KPa<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>, resistência à tração de 12,43 a 155,57 MPa e para alongação de 2,14 a 125,33%. Os filmes foram considerados promissores, do ponto de vista da aparência visual, manuseabilidade e continuidade. Os filmes com nanoargila e óleos essenciais apresentaram alta solubilidade e baixa PVA, resistência à tração e alongação quando comparados aos filmes proteicos com gelatina. O isolado proteico de tilápia apresentou alto potencial para a produção de filmes, desta forma sua utilização poderia agregar lucros para as indústrias processadoras, reduzindo os impactos ambientais.

**Palavras-chave:** isolado proteico; tilápia; pescado

## ABSTRACT

SCUDELER, Cintia Granzotti da Silva. Federal University of Grande Dourados, October 2019. **“Development and characterization of biopolymeric films from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues with incorporation of essential oils, nanoclay, gelatin and plasticizers”**. Advisor Prof<sup>o</sup> Dr. Gustavo Graciano Fonseca. Co-advisor Prof<sup>o</sup> Dr. William Renzo Cortez-Vega.

Films obtained from renewable sources are considered promising due to their degradation capacity, reducing environmental impacts. The objective of this work was to develop tilapia protein isolate films with different concentrations of glycerol, nanoclay, clove and oregano essential oils and tilapia protein isolate films with different concentrations of gelatin, glycerol and sorbitol; Evaluating their properties of thickness, water solubility, acid solubility, water vapor permeability (PVA), tensile strength, elongation, color, opacity, the microstructure of the obtained films, thermal characteristics and antimicrobial activity of films with addition of essential oils; compare the characteristics of the formulations. The protein isolate was obtained by the protein alkaline solubilization technique and isoelectric point precipitation from mechanically separated tilapia meat. To develop the films with nanoclay and essential oils, the technique of casting and fractional experimental planning 2<sup>(5-1)</sup> was used. To obtain the gelatin protein films the same technique was used with nine experiments. For the development of all films, the filmogenic solution was made with 100 mL of distilled water. For nanoclay protein films, the following concentrations were used: protein isolate (0.5, 1.0 and 1.5 g); glycerol plasticizer (0.2; 0.3 and 0.4 g); oregano and clove essential oil (0.0, 0.2 and 0.4 g) and nanoclay (0.1, 0.2 and 0.3 g). For gelatin films: protein isolate (0.0; 0.75; 1.5; 2.25 and 3.0 g); gelatin (3.0; 2.25; 1.5; 0.75 and 0.0 g); sorbitol or glycerol (0.6, 0.45, 0.3, 0.15 and 0.0 g). The antimicrobial activity of protein films with nanoclay and essential oils was verified by disk diffusion method in relation to *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. The results of nanoclay and essential oils protein films were submitted to the response surface methodology to study the simultaneous effects of independent variables on the analyzed parameters. The protein isolate obtained from mechanically separated tilapia meat showed 85.15% protein, good water and oil retention capacity. They presented water solubility values ranging from 30.62 to 85.45% and acid solubility from 13.19 to 45.92%. The values obtained for PVA are between 2.38 and 4.02 gmm d<sup>-1</sup>KPa<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>, tensile strength from 0.65 to 2.76 MPa and for elongation from 0.29 to 2.07%. For antimicrobial analysis, essential oils did not show positive activity. Gelatin protein films exhibited water solubility values ranging from 4.11 to 28.72%, PVA values ranged from 7.12 to 16.36 gmm d<sup>-1</sup>KPa<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>, tensile strength 12, 43 to 155.57 MPa and for elongation from 2.14 to 125.33%. The films were considered promising from the point of view of visual appearance, maneuverability and continuity. Nanoclay and essential oil films showed high solubility and low PVA, tensile strength and elongation when compared to gelatin protein films. Tilapia protein isolate had high potential for film production, so its use could add profits to the processing industries, reducing environmental impacts.

**Keywords:** protein isolate; tilapia; fish

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO.....	17
1.3 OBJETIVOS.....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 PESCADO.....	18
2.1.1 Resíduos de pescado.....	18
2.1.2 Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	19
2.1.3 Aproveitamento de resíduos de tilápia do Nilo.....	20
2.1.4 Proteínas do pescado.....	21
2.2 FILMES BIODEGRADÁVEIS.....	21
2.2.1 Aditivos em filmes biodegradáveis.....	22
2.2.1.1 Plastificantes.....	22
2.2.1.2 Óleos essenciais.....	23
2.2.1.3 Nanocompósitos.....	24
2.3 REFERÊNCIAS.....	25
<b>3 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) COM INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOARGILA .....</b>	<b>30</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.2.1 Obtenção do isolado proteico a partir de carne mecanicamente separada de resíduos de tilápia.....	33
3.2.1.1 Resíduos de tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	33
3.2.1.2 Carne mecanicamente separada (CMS).....	33
3.2.1.3 Isolado proteico.....	33
3.2.2.1 Potencial isoelétrico.....	34
3.2.2.2 Composição proximal.....	34
3.2.2.3 Solubilidade proteica.....	34
3.2.2.4 Capacidade de retenção de água (CRA).....	35
3.2.2.5 Capacidade de retenção de óleo (CRO).....	35
3.2.2.6 Cor.....	36
3.2.3 Obtenção de filmes de biopolímero.....	36
3.2.4 Avaliação subjetiva de filmes biopoliméricos.....	38
3.2.5 Caracterização de filmes biopoliméricos.....	39
3.2.5.1 Espessura.....	39
3.2.5.2 Solubilidade em Água.....	39
3.2.5.3 Solubilidade em ácido.....	39
3.2.5.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	40
3.2.5.5 Resistência à tração e alongação.....	40
3.2.5.6 Cor.....	41
3.2.5.7 Opacidade.....	41
3.2.5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	41
3.2.5.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	42
3.2.5.10 Difração de raios X (DRX).....	42
3.2.5.11 Espectroscopia Infravermelha (FTIR).....	42
3.2.5.12 Atividade antimicrobiana dos filmes (teste de difusão em ágar).....	43
3.2.5.13 Análise estatística.....	43

<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
<i>3.3.1 Caracterização da CMS</i> .....	44
<b>3.3.1.1. Potencial isoelétrico</b> .....	44
<b>3.3.1.2 Composição proximal</b> .....	44
<i>3.3.2 Caracterização do isolado proteico</i> .....	45
<b>3.3.2.1 Composição proximal</b> .....	45
<b>3.3.2.2 Capacidade de retenção de água (CRA)</b> .....	46
<b>3.3.2.3 Capacidade de retenção de óleo (CRO)</b> .....	47
<b>3.3.2.4 Cor</b> .....	47
<i>3.3.3 Obtenção e avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos</i> .....	48
<i>3.3.4 Caracterização dos filmes biopoliméricos</i> .....	50
<b>3.3.4.1 Espessura</b> .....	53
<b>3.3.4.2 Solubilidade em água</b> .....	54
<b>3.3.4.3 Solubilidade ácida</b> .....	56
<b>3.3.4.4 Permeabilidade ao vapor de água</b> .....	57
<b>3.3.4.5 Resistência à tração</b> .....	59
<b>3.3.4.6 Elongação</b> .....	61
<b>3.3.4.7 Cor e opacidade</b> .....	62
<b>3.3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	64
<b>3.3.4.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	66
<b>3.3.4.10 Análise de Difração de Raios-X</b> .....	67
<b>3.3.4.10 Espectroscopia Infravermelha (FTIR)</b> .....	69
<b>3.3.4.11 Atividade antimicrobiana</b> .....	70
<b>3.4 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>3.5 REFERÊNCIAS</b> .....	72
<b>4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) COM INCORPORAÇÃO DE GELATINA</b> .....	<b>79</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	80
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	81
<i>4.2.1 Obtenção dos filmes biopoliméricos</i> .....	81
<i>4.2.2 Avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos</i> .....	82
<b>4.2.3 Caracterização de filmes biopoliméricos</b> .....	82
<b>4.2.3.1 Espessura</b> .....	82
<b>4.2.3.2 Solubilidade em Água</b> .....	83
<b>4.2.3.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</b> .....	83
<b>4.2.3.4 Resistência à tração e alongação</b> .....	84
<b>4.2.3.5 Cor</b> .....	84
<b>4.2.3.6 Opacidade</b> .....	85
<b>4.2.3.7 Análise estatística</b> .....	85
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	86
<i>4.3.1 Obtenção e avaliação subjetiva dos filmes</i> .....	86
<i>4.3.2 Caracterização dos filmes biopoliméricos</i> .....	87
<b>4.3.2.1 Espessura</b> .....	88
<b>4.3.2.2 Solubilidade em água</b> .....	89
<b>4.3.2.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</b> .....	89
<b>4.3.2.4 Resistência à tração e alongação</b> .....	90
<b>4.3.2.5 Cor e opacidade</b> .....	91
<b>4.4 CONCLUSÃO</b> .....	93
<b>4.5 REFERÊNCIAS</b> .....	93
<b>5. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Impactos ambientais ocasionados por descarte de resíduos de materiais plásticos de fonte petroquímica gera constante preocupação global, visto que sua degradação leva centenas de anos. Com a intenção de substituir parcialmente esses materiais, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de encontrar materiais poliméricos renováveis e ecológicos, incluindo o emprego de polímeros biodegradáveis (KHWALDIA et al., 2010).

As películas podem ser elaboradas com diferentes tipos de materiais, sendo mais utilizados os polissacarídeos, as proteínas e os lipídeos (FALGUERA et al., 2011), por serem obtidos a partir de matérias-primas de baixo custo e ao fato de serem biodegradáveis. Apresentam ainda outras vantagens, como serem consumidas com o produto, reterem aromas, carrear aditivos alimentícios ou componentes com atividades antimicrobiana e/ou antioxidante (PRANOTTO et al., 2005).

O interesse de manter a qualidade dos produtos embalados e, ao mesmo tempo, reduzir o desperdício de embalagens, tem encorajado a exploração de novos materiais como embalagens, incluindo os filmes biodegradáveis formulados com matérias-primas oriundas de recursos renováveis (SOUZA et al., 2012).

Os filmes biodegradáveis podem atuar como barreira à elementos externos, protegendo os produtos acondicionados de possíveis danos biológicos e físicos, impedindo a volatilização de compostos e a diminuição de umidade, aumentando desta forma, a vida útil do produto (RHIM; NG, 2007). As proteínas possuem estrutura com grande variedade em suas propriedades funcionais, principalmente um potencial para ligações intermoleculares. Filmes produzidos à base de proteínas podem constituir ligações em posições diferentes e fornecem grande potencial para a formação de uma gama de ligações (OU et al., 2005). As proteínas de pescado possuem algumas propriedades vantajosas na produção de filmes, como a habilidade para formar redes, plasticidade e elasticidade, além de apresentar boa barreira ao oxigênio. Porém, sua barreira ao vapor de água é baixa em função de sua natureza hidrofílica, sendo que esta propriedade pode ser alterada por meio de adição de plastificantes e/ou aditivos (CORTEZ-VEGA et al., 2014).

Nos últimos anos, os pesquisadores dedicaram-se à busca por embalagens que além de proteger, também possam interagir com o produto. As embalagens ativas são elaboradas para

que haja interação de forma desejável com o produto, alterando as formas de acondicionamento visando aumentar a vida útil e melhorar suas propriedades sensoriais e sua segurança. Os filmes que estão em contato com a superfície do produto e recebem aditivos liberam de maneira gradativa o composto para a superfície do alimento, onde a maior parte das reações químicas e microbiológicas ocorrem (SOARES et al., 2006). A incorporação de óleos essenciais à matriz polimérica, seria uma utilizada para promover proteção antimicrobiana e antioxidante ao produto.

Os óleos essenciais de condimentos podem conter diversos componentes que apresentam propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis por estas características. Os compostos fenólicos são hidrofóbicos e a membrana celular microbiana é seu sítio de ação, onde acumulam-se, provocando desarranjo na estrutura da membrana e em sua função. Os mesmos entram na célula bacteriana, promovendo atividade inibitória no citoplasma celular, promovendo lise e liberação do ATP intracelular (WALSH et al., 2003). Os diferentes compostos presentes nos óleos essenciais produzem um arranjo de antioxidantes que podem atuar por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (SHAHIDI, 1997).

O desenvolvimento de filmes biopoliméricos a partir de fontes renováveis contempla tais anseios, tendo em vista que atende duas questões importantes: a utilização de embalagens biodegradáveis e a possibilidade de redução do uso de aditivos sintéticos nos alimentos, haja vista que a inclusão de agentes com atividades antimicrobianas à sua matriz, como os óleos essenciais, conferem proteção aos alimentos.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Após a Introdução Geral (**Capítulo 1**), o trabalho foi organizado da seguinte forma:

**Capítulo 2:** Revisão da literatura;

**Capítulo 3:** Artigo 1: Desenvolvimento de filmes biopoliméricos de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de óleos essenciais e nanoargila;

**Capítulo 4:** Artigo 2: Desenvolvimento de filmes biopoliméricos de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com incorporação de gelatina.

## 1.3 OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

- ✓ Desenvolver e caracterizar filmes à base de isolado proteico de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com adição de diferentes concentrações de nanoargila, glicerol e/ou óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano.
- ✓ Desenvolver e caracterizar filmes à base de isolado proteico de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com adição de diferentes concentrações de gelatina, glicerol ou sorbitol.

Objetivos Específicos:

- ✓ Caracterizar os resíduos de tilápia quanto à composição proximal;
- ✓ Obter e caracterizar isolado proteico;
- ✓ Desenvolver filmes a partir de solução filmogênica contendo isolado proteico de tilápia, plastificante glicerol, óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano, nanoargila montmorinólita;
- ✓ Desenvolver filmes a partir de solução filmogênica contendo isolado proteico de tilápia, gelatina e plastificantes glicerol ou sorbitol;
- ✓ Caracterizar os filmes biopoliméricos;
- ✓ Avaliar o efeito das concentrações de plastificante, isolado proteico, óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano, nanoargila montmorinólita, gelatina e plastificantes nas propriedades físicas, estruturais e térmicas dos filmes biopoliméricos;
- ✓ Comparar as características das formulações desenvolvidas.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 PESCADO**

#### **2.1.1 Resíduos de pescado**

A produção mundial de pescado aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Em 2014 foram produzidas 167,2 milhões de toneladas (FAO, 2016a). Em 2011 no Brasil, foram produzidas 1.431.974,4 toneladas de pescado, sendo que a região Nordeste apresentou a maior produção de pescado do país, com 31,7%, seguido das regiões Sul com 23,5%, Norte 22,8%, Sudeste 15,8% e Centro-Oeste com 6,2% (BRASIL, 2011).

De acordo com a FAO, (2016b), os resíduos sólidos de pescado resultantes da cadeia produtiva da pesca e aquicultura representam em média 20% do volume de 167,2 milhões de toneladas geradas no ano de 2014, devido principalmente ao não aproveitamento destes recursos como matéria-prima para a fabricação de outros produtos (BUENO et al., 2011). Neste contexto, a produção de resíduos torna-se um desafio para o setor pesqueiro, tendo em vista que, aproximadamente 50% do volume diário processado nas indústrias é resíduo sólido, que acaba por ser descartado em córregos, rios, mares e lixões (VICTORINO et al., 2017).

Uma alternativa viável para o aproveitamento dos resíduos de pescado é a produção de farinha, largamente utilizada na aquicultura, como principal fonte de proteína nas rações para a maioria das espécies cultivadas (GALDIOLI et al., 2001). O desenvolvimento de couro, a partir de resíduos de peles do processo de filetagem do pescado para a produção de bolsas, carteiras, confecção de vestuários, entre outros artefatos, representa uma fonte alternativa de renda para as indústrias e entrepostos pesqueiros (SOUZA et al., 2003).

Além do aproveitamento dos resíduos destinado ao consumo animal e a produção de artefatos, tais resíduos podem ainda ser transformados em ingredientes para incorporação nos alimentos (BOSCOLO; FEIDEN, 2007), reduzindo o impacto ambiental e aumentando a lucratividade das indústrias de pescado. O aproveitamento de resíduos de pescado para elaboração de produtos representa uma alternativa para solucionar a problemática do baixo consumo de pescado no Brasil, tendo em vista que a falta de praticidade e de padronização do produto no que diz respeito às características de sabor, presença ou não de espinhas, forma de preparo e valor nutricional determinavam o principal entrave para o aumento do consumo dessa matriz alimentar (DE SOUZA, 2002).

Diante deste cenário, a criação de alternativas tecnológicas, com valor agregado que permitam o gerenciamento dos resíduos de pescado constitui uma atividade promissora devido aos benefícios, como o combate à fome, a geração de empregos e o desenvolvimento sustentável (SIMÕES et al., 2007). Junto com o avanço da atividade aquícola, a industrialização de pescado tem crescido de forma constante, visando o aprimoramento no processo de obtenção de diferentes apresentações do pescado ao mercado consumidor (OLIVEIRA et al., 2012). Baseado nesses aspectos, verifica-se uma tendência na elaboração de diversos produtos como linguças, apresuntados, *nuggets*, hambúrgueres, acrescentados de ingredientes como sal, farinha de trigo, especiarias e outros, resultando em alimentos com excelentes características sensoriais e nutricionais (XAVIER, 2009).

### **2.1.2 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe classificado taxonomicamente na Classe Osteichthyes, Superordem Teleostei, Ordem Perciformes e Família Chichlidae (ORR, 1986). É uma espécie de escamas, que possui corpo um pouco alto e comprimido. Apresenta coloração verde-oliva prateada, com presença de sombras verticais negras. A nadadeira dorsal também é verde-oliva, com linha vermelha e branca até cinza-escuro com pontos oblíquos. A nadadeira caudal é pontuada na porção dorsal, com coloração vermelha ou amarela na porção ventral. Pode alcançar 45 cm de comprimento e pesar 2,5 kg (HONORATO et al., 2013).

As tilápias possuem fácil adaptabilidade à diversas condições ambientais, além de serem resistentes a doenças, geralmente, podem ser criadas tanto em lagos naturais e açudes como também em represas artificiais ou tanques-rede. Além disso, as tilápias não requerem água com grande quantidade de oxigênio, resistindo muito bem a alterações bruscas de temperatura. Da mesma forma, são consideravelmente fáceis de alimentar e se reproduzem com bastante facilidade. Tais características tornam a criação de tilápias um negócio rentável e promissor (KUBITZA, 2000).

A produção de tilápia do Nilo no Brasil saltou 223% entre os anos de 2005 e 2015 com a modernização e a intensificação da produção em tanques-rede em reservatórios e em viveiros escavados. A produção estimada pelo Ibama em 2005, foi de 67.850,5 toneladas e em 2015 passou a 219.329 toneladas (BRASIL, 2019). No estado de Mato Grosso do Sul, a produção de tilápia foi de 1.244,8 toneladas em 2018 (IBGE, 2019).

### 2.1.3 Aproveitamento de resíduo de tilápia do Nilo

A tilápia (*Oreochromis niloticus*) é a espécie que apresenta maiores índices de produção na aquicultura nacional, devido as suas características rústicas, genéticas, reprodutivas e mercadológicas. Os principais produtos comercializados desta espécie são pescados inteiros congelados e principalmente filés, que representam a forma mais consumida pelos mercados nacional e internacional (BOSCOLO; FEIDEN, 2007). Entretanto, apesar dos diversos aspectos positivos relativos ao cultivo de tilápia, uma das características indesejáveis desta espécie é o baixo rendimento de filé (FITZSIMMONS et al., 2011). Embora este rendimento dependa da eficiência manual do operário ou de equipamentos, caso a filetagem seja automatizada, da forma anatômica do corpo, do tamanho do peixe bem como do peso das vísceras, pele e nadadeiras, os filés e resíduos representavam aproximadamente 35 e 65% do processamento de tilápia, respectivamente (BOSCOLO; FEIDEN, 2007). Além disso, devido à heterogeneidade de crescimento dos peixes, durante a despesca, pode ocorrer o descarte de animais que não atingem o tamanho comercial adequado e, conseqüentemente, comprometem a aceitação dos filés, os quais geralmente são subutilizados como resíduos de produção. Normalmente, esses grupos heterogêneos representam de 12 a 14% durante a despesca de tilápias (LIMA et al., 2009).

Em contrapartida, os resíduos apresentam alto valor proteico, minerais e lipídios, incluindo ácidos graxos essenciais, principalmente da série ômega-3, como o ácido eicosapentaenóico e o docosahexaenóico, que são responsáveis por numerosos efeitos benéficos à saúde humana, como diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, diminuição nas taxas de colesterol no sangue, prevenção de câncer, dentre outros (STEVANATO et al., 2007). É importante resaltar que a indisponibilidade de produtos industrializados a base de pescado, em quantidade e qualidade, a falta de praticidade e a pouca validade comercial, contribuem para o baixo consumo de pescado no país (BOMBARDELI et al., 2005). Desta maneira, pesquisadores têm direcionado os estudos para elaboração de novos produtos derivados de pescado a base de resíduos de tilápia, minimizando perdas econômicas de indústrias e entrepostos e reunindo todos os atributos exigidos pelos consumidores atuais (BOSCOLO; FEIDEN, 2007).

#### **2.1.4 Proteínas do pescado**

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

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

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

As proteínas miofibrilares, que representam aproximadamente 66 - 77% das proteínas totais têm um papel fundamental na coagulação e formação de gel, quando se processa o músculo de pescado. Estas formam as miofibrilas, e conferem às células musculares sua propriedade contráctil, influenciando tecnologicamente nas qualidades culinárias e comerciais das carnes, pois são responsáveis pela capacidade de retenção de água, propriedades emulsificantes e também pela brandura da carne, contendo ainda quantidades importantes de aminoácidos essenciais, contribuindo assim em mais de 70% do suporte proteico devido ao consumo de carne (KUHN et al., 2002). As proteínas miofibrilares do pescado apresentam a vantagem de possuírem elevado valor biológico, decorrente de alta sensibilidade à hidrólise e composição balanceada em aminoácidos, incluindo aqueles limitantes em proteínas de origem vegetal, como a metionina e a cisteína (NEVES et al., 2004). Uma das utilizações recentes de isolados proteicos de pescado tem sido a de matriz biopolimérica para a obtenção de filmes e coberturas comestíveis.

## **2.2 FILMES BIODEGRADÁVEIS**

Sabe-se que as embalagens plásticas garantem proteção aos diferentes produtos alimentícios; mas também são as maiores responsáveis pela contaminação por acúmulo no meio ambiente, uma vez que seu processo de degradação é difícil ou demorado (GONTARD et al., 1992). As alternativas encontradas para minimizar o efeito negativo dos resíduos gerados pelas

embalagens deste tipo vão desde a reciclagem, até a substituição parcial ou total dos materiais sintéticos por biomateriais (GARCIA et al., 2000). O desenvolvimento de tecnologia de biomateriais, aplicáveis aos vários setores industriais, na área de embalagens, receberam atenção especial em relação à questão da preservação do ambiente.

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

O desenvolvimento e a caracterização de filmes biopoliméricos e/ou biodegradáveis têm sido muito estudados devido ao seu potencial para uso como embalagens, e também pela questão da biodegradabilidade e diversas publicações ocorrendo a cerca de filmes biopoliméricos e suas caracterizações (BONILLA et al., 2012).

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

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

## **2.2.1 Aditivos em filmes biodegradáveis**

### **2.2.1.1 Plastificantes**

Os plastificantes são substâncias com alto ponto de fusão e baixa volatilidade. Quando adicionados a outro material provocam mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas (GENNADIOS et al., 1994). Constituem moléculas pequenas que ocupam posições

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

Entre os plastificantes compatíveis com água estão a glicose, sacarose, xilol, sorbitol e glicerol, que tem efeito plastificante sobre as propriedades de materiais poliméricos com alta temperatura de transição vítrea, especialmente filmes a base de biopolímeros (CHANG et al., 2006). Contudo, os plastificantes mais utilizados na elaboração de biofilmes a partir de proteínas ou polissacarídeos são os polióis, como glicerol, sorbitol ou uma mistura destes (GENNADIOS et al., 1994).

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

### **2.2.1.2 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos, possuem odor característico, podendo ser obtidos através de diversas partes das plantas (BURT, 2004). Eles são amplamente utilizados por sua atividade antimicrobiana e vêm sendo empregados como conservantes naturais para ampliar a vida útil de produtos alimentares (TEIXEIRA et al., 2013).

Entre os óleos essenciais, o óleo essencial de orégano destaca-se dos demais por apresentar-se eficaz na atuação como agente antimicrobiano, atribuindo-se esta característica à presença de compostos fenólicos em sua composição, principalmente o timol e o carvacol (AGUIRRE et al., 2013). O óleo essencial de cravo-da-índia possui atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante, atribuindo estas características a substância eugenol em sua composição (OLIVEIRA et al., 2012).

O efeito antimicrobiano está associado à mudanças na permeabilidade e na integridade da membrana celular bacteriana, podendo apresentar variados mecanismos de ação dos óleos

essenciais são vários. Uma característica importante dos óleos essenciais e seus componentes é a sua hidrofobicidade, a qual lhes permite partição dos lipídios da membrana celular bacteriana e mitocôndrias, perturbando as estruturas e deixando-as mais permeáveis, podendo ocorrer o extravasamento de íons e outros conteúdos intracelulares (LAMBERT et al., 2001). Estudos mostram que os compostos fenólicos agem na membrana citoplasmática, interrompendo a força próton motriz, o fluxo de elétrons e o transporte ativo, promovendo a coagulação do conteúdo intracelular (DAVIDSON; TAYLOR, 2007).

### **2.2.1.3 Nanocompósitos**

Polímeros nanocompósitos são materiais híbridos formados por uma matriz reforçada de polímero com uma fibra, uma plaqueta, ou uma partícula com dimensão na escala do nanômetro (PANDEY et al., 2005). As partículas se dispersam na matriz do polímero, devido ao tamanho do nanômetro, os mesmos, exibem fortemente melhorias das propriedades físico-químicas, mecânicas, ópticas e térmicas quando comparadas com o polímero puro ou com os compósitos convencionais (CORTEZ-VEGA et al., 2014). Este fato está associado ao pequeno tamanho das partículas, à estrutura superficial das nanoestruturas e à composição química, que resulta em ampla área superficial específica da fase dispersa e, conseqüentemente, potencializa as forças interfaciais das interações polímero-fase dispersa (BOUWMEESTER et al., 2009). Por este motivo, é necessário que o enchimento esteja disperso na matriz de maneira uniformemente polimérica para garantir a homogeneidade de suas propriedades e obtenha-se aproveitamento máximo da alta área superficial (ARORA; PADUA, 2010).

A fase dispersa destes materiais é constituída por argilominerais, filossilicatos hidratados estruturados em camadas sobrepostas na proporção 1:2. Os filossilicatos mais utilizados em nanocompósitos pertencem à família das esmectitas, como as montmorilonitas, hectoritas e saponitas, sendo a montmorilonita mais utilizada entre elas. As argilas, para tornarem-se organofílicas, passam por modificações estruturais com substâncias orgânicas que apresentam afinidade química tornando-as hidrofóbicas (PAIVA et al., 2008).

Nanocompósitos de polímero-argila representam uma classe de materiais híbridos constituídos de polímeros orgânicos e enchimentos em nano-escala da argila (LAGALY, 1999). Frequentemente a montmorilonita, a hecrite e a saponita são os silicatos mais utilizados, que quando combinados com os materiais poliméricos podem dar forma aos nanocompósitos (RAY; OKAMOTO, 2003).

As argilas, para serem organofílicas, são modificadas com substâncias orgânicas que apresentam afinidade química com sua estrutura cristalina e tornando-se hidrofóbicas (PAIVA et al., 2008). A montmorilonita é um mineral argiloso originário da erosão de cinza vulcânica que por ser polar, não é compatível com a maioria dos polímeros que são menos polares ou apolares e, portanto, deve ser modificada. Para tanto, são utilizados agentes compatibilizantes que se ligam à superfície da montmorilonita e que vão interagir com a resina para formar um sistema miscível, sendo esta compatibilização um dos maiores desafios para utilização de nanocompósitos (HELAL et al., 2015).

## 2.3 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. **Food Bioscience**, 1, 2-9, 2013.

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

ARORA, A.; PADUA, G. W. Review: Nanocomposites in food packaging. **Journal of Food Science**, 75, 43-49, 2010.

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

BOMBARDELLI, R. A.; SYPERRECK, M. A.; SANCHES, E. A. Current situation and perspectives for consumption, processing and aggregation of value to fishery. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, 8(2), 181-195, 2005.

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

BOSCOLO, W. R., FEIDEN, A. Industrialização de tilápias. GFM Gráfica & Editora, Toledo, 2007.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; TEN VOORDE, S. E. C. G.; WIJINHOVEN, S. W. P.; MARVIN, H J. P. Review of Health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 53, 52-62, 2009.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura - MAPA Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011. Brasília: MPA, 2011. Disponível em: . Acesso em: 27 ago. 2019.

BUENO, C. M.; ALVIM, I. D.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; PORTELLA, M. C.; GROSSO, C. Produção de gelatina de pele de tilápia e sua utilização para obtenção de micropartículas contendo óleo de salmão. **Brazilian Journal of Food Technology**, 14, 65-73, 2011.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, 94(3), 223-253, 2004.

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

CORTEZ-VEGA, W. R.; PIZATO, S.; DE SOUZA, J. T. A.; PRENTICE, C. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut 'Formosa' papaya. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 22, 197-202, 2014.

DAVIDSON, P. M.; TAYLOR, M. T. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, 713-734, 2007.

DE SOUZA, M. L. R. Comparison of six filleting methods and their relation with fillet yield and by-products of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31(3), 1076-1084, 2002.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Novo relatório da FAO aponta que produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até 2025. FAO, 2016a. Disponível em: . Acesso em: 13 abril. 2018.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016b. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2019.

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: International Symposium in 155 8 Tilapia in Aquaculture, 9th., 2011, China. Proceedings. China: Shanghai Ocean University, 2011.

GALDIOLI, E. M.; HAYASHI, C.; FARIA, A. C. E. A.; SOARES, C. Substituição parcial e total da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para alevinos de piavuçu, *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum**, 23(4), 835-840, 2001.

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

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In: Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. (eds). Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, 57, 190-199, 1992.

HELAL, E.; DEMARQUETTE, NICOLE, R.; AMURIN, L. G.; DAVID, E.; CARASTAN, D. J.; FRECHETTE, M. Styrenic block copolymer-based nanocomposites: Implications of nanostructuring and nanofiller tailored dispersion on the dielectric properties. **Polymer**, 64, 139-152, 2015.

HONORATO, C. A.; STECH, M. R.; TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C.; CARNEIRO, D. J. Micro capsules diets for sex reversal in tilápia do Nilo - Review. **Revista Eletrônica Nutritime**, 11(2), 2300-2313, 2013.

IBGE – Pesquisa da Pecuária Municipal. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940#resultado>. Acesso em: 09 jun. 2019.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. São Paulo: Acqua Supre Com. Suprim. Aqüicultura Ltda. 289 p. 2000.

KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D.; KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases and inhibitors in surimi processing. **Revista Brasileira de Agrociência**, 8, 5-11, 2002.

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

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, 91, 453-462, 2001.

LIMA, A. K. S.; AMANCIO, A. L. L.; CASALI, R. B.; SANTOS, L. M.; ROCHA, M. M. R. M. Avaliação técnico-econômica da criação de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) no município de Bananeiras, estado da Paraíba. **Boletim Técnico-Científico do Cepnor**, 9(1), 159-167, 2009.

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

NEVES, R. A. M.; MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Characterization of enzymatic fish hydrolysates. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24, 101-108, 2004.

OLIVEIRA, M. C.; CRUZ, G. R. B.; ALMEIDA, N. M. Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Pulp-of-Tilapia-Based (*Oreochromis niloticus*) Meatballs. **Ciências Biológicas e da Saúde**, 14(1), 37-44, 2012.

ORR, R.T. Biologia de Vertebrados. Peixes e Vertebrados Semelhantes a Peixes. Editora Roca, 1986.

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

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

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

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

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

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

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

SIMÕES, M. R.; RIBEIRO, C. F. A.; RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K. J.; MURR, F. E. X. Physicochemical and microbiological composition and yield of thai-style tilapia Fillets (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(3), 608-613, 2007.

SOUZA, M. L. R.; DOURADO, D. M.; MACHADO, S.D.; BUCCINI, D. F.; JARDIM, M. I. A.; MATIAS, R.; CORREIA, C.; FERREIRA, I. C. Analysis of the Skin of Three Fish Species: Histology, Morphometry and Resistance Tests. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32(6), 1551-1559, 2003.

STEVANATO, F. B.; PETENUCCI, M. E.; MATSUSHITA, M.; MESOMO, M. C.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. E. L.; ALMEIDA, V. V.; VISENTAINER, J. V. Chemical and sensorial evaluation of Fsh meal in soup. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, 27, 567-571, 2007.

STORI, F. T.; BONILHA, L. E. C.; PESSATTI, M. L. Proposta de aproveitamento dos resíduos das indústrias de beneficiamento de pescado de Santa Catarina com base num sistema gerencial de bolsa de resíduos. 2002. In: GARCIA, B. G. (Ed.). Responsabilidade Social das empresas: uma contribuição das Universidades. São Paulo: **Editora Peirópolis**, 431, 373-406, 2003.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595, 2013.

VICTORINO, B.V.P.; BEZERRA, A.E.; AMORIM, E.; VALADÃO, R, C.; OLIVEIRA, G, M. O resíduo de pescado e o uso sustentável na elaboração de coprodutos. **Revista Mundi, Meio Ambiente e Agrárias**. Curitiba, 2017. Disponível em: <file:///C:/Users/natal\_000/Downloads/223-2300-1-PB.pdf>. Acesso em: 19 abril. 2018.

XAVIER, Q. A. S. Desenvolvimento e caracterização de embutido de piranha (*Serrasalmus* sp). Fortaleza, 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

### 3 ELABORAÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COM INCORPORAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOARGILA

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes biopoliméricos a partir de proteína extraída da carne mecanicamente separada (CMS) da carcaça de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), incorporados com glicerol, nanoargila montmorinólita e óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano. A proteína extraída foi caracterizada quanto ao seu potencial isoelétrico, composição proximal, solubilidade, capacidade de retenção de água (CRA), capacidade de retenção de óleo (CRO) e cor. Para obtenção dos filmes utilizou-se a técnica de *casting* e planejamento experimental fracionário  $2^{(5-1)}$ . Os filmes foram caracterizados quanto à espessura, solubilidade em água, solubilidade em ácido, permeabilidade ao vapor de água (PVA) e propriedades mecânicas, foram também avaliados em relação a sua microestrutura, propriedades térmicas e atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana dos filmes, em relação aos seguintes microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, foi verificada através do método de difusão em disco. O isolado proteico obtido da CMS de tilápia apresentou 85,15% de proteína, boa capacidade de retenção de água (CRA) que foi de 63,15% para o pH 3; 35,25% para pH 5; 37,45% para pH 7; 42,98% para pH 9 e 88,50% para pH 11 e CRO que foi de 5,3 mL de óleo por grama de proteína. Os valores de solubilidade em água variaram entre 30,62 e 85,45%, a solubilidade em ácido entre 13,19 e 45,92%, PVA entre 2,38 e 4,02 g mm dia<sup>-1</sup>kPa<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. Os valores para resistência à tração variaram entre 0,65 a 2,76 MPa e os valores de alongação de 0,29 a 2,07%. Os filmes não apresentaram halo antimicrobiano para todos os microrganismos analisados quando o óleo foi associado ao filme. Desta forma, verificou-se através das análises realizadas que os filmes apresentaram resultados promissores quanto a sua aplicação.

**Palavras-chave:** pescado; resíduos; isolado proteico

**Abstract:** The aim of this work was to develop biopolymer films from protein extracted from mechanically separated meat (MSM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) carcass, incorporated with glycerol, nanoclay montmorinólita and clove and oregano essential oils. The extracted protein was characterized for its isoelectric potential, proximate composition, solubility, water retention capacity (WRC), oil retention capacity (ORC) and color. To obtain the films, the casting technique and fractional experimental design  $2^{(5-1)}$ . The films were characterized in terms of thickness, water solubility, acid solubility, water vapor permeability (WVP) and mechanical properties were also evaluated in relation to their microstructure and thermal properties. The antimicrobial activity of the films, in relation to the following microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*, was verified by the disc diffusion method. The protein isolate obtained from MSM of Nile tilapia showed 85.15% protein, good WRC, which was 63.15% for pH 3; 35.25% for pH 5; 37.45% for pH 7; 42.98% for pH 9 and 88.50% for pH 11 and ORC which was 5.3 mL of oil per gram of protein. The solubility values in water ranged from 30.62 to 85.45%, the solubility in acid between 13.19 and 45.92%, WVP between 2.38 and 4.02 g mm dia<sup>-1</sup>kPa<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. Values for tensile strength ranged from 0.65 to 2.76

MPa and elongation values from 0.29 to 2.07%. The did not present antimicrobial halo for all microorganisms analyzed when the oil was associated with the film.

**Keywords:** fish; waste; protein isolate

### 3.1 INTRODUÇÃO

O isolado proteico de pescado consiste em média em 75% de proteína, extraído de resíduos da industrialização e são basicamente produtos desidratados e moídos, que podem conter odor de pescado ou não, dependendo da metodologia adotada para sua extração (BRASILEIRO et al., 2012).

Para a elaboração dos filmes é necessária a utilização de vários componentes que agem de forma específica na solução filmogênica. As formulações são compostas por pelo menos um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, metanol, etanol, acetona, entre outros), plastificante (glicerol, sorbitol) e agente ajustador de pH (NaOH, HCl entre outros) (BERTAN et al., 2005).

O glicerol é um composto orgânico pertencente à classe dos polióis, atua como agente plastificante, devido as suas características como estabilidade e compatibilidade com as cadeias biopoliméricas dos biofilmes (CHILLO et al., 2008). Encontra-se presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal na sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido esteárico, oleico, palmítico, láurico formando a molécula de triacilglicerol (KNOTHE et al., 2006).

A nanoargila é constituída por argilominerais, que são filossilicatos hidratados, pertencentes à família das esmectitas, onde a montmorinólita, hectoritas e saponitas são as mais frequentemente utilizadas. A introdução de nanoargilas em filmes biodegradáveis pode ser utilizada para melhorar suas propriedades mecânicas (SLAVUTSKY et al., 2012).

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos e voláteis extraídos de componentes das plantas como raízes, flores, caules, folhas, sementes, frutos e da planta inteira (MONICA; IOAN, 2019). O óleo essencial de cravo-da-índia possui o eugenol em sua composição, substância responsável pela atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (OLIVEIRA et al., 2012). O óleo essencial de orégano possui ação antimicrobiana, atribuindo-se esta característica à presença de compostos fenólicos em sua composição, principalmente o timol e o carvacol (AGUIRRE et al., 2013).

Assim, objetivou-se com este trabalho produzir filmes a partir dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo, glicerol, nanoargila e óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtenção do isolado proteico a partir de carne mecanicamente separada de resíduos de tilápia**

#### **3.2.1.1 Resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram obtidos de indústria de processamento de pescado de Dourados, MS - Brasil. As amostras foram embaladas em sacos plásticos de polietileno, acondicionadas e transportadas em caixas de isopor com gelo para o Laboratório de Bioengenharia, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

#### **3.2.1.2 Carne mecanicamente separada (CMS)**

A carne mecanicamente separada (CMS) foi produzida a partir dos resíduos de tilápia no diâmetro de partícula de 3 mm, utilizando-se uma despoldadeira modelo 694 (Baader, Alemanha), operando a 6 °C na entrada e 10 °C na saída, 24h após o abate. A CMS foi mantida a -18 °C.

#### **3.2.1.3 Isolado proteico**

A CMS obtida de tilápia do Nilo foi homogeneizada com água destilada na proporção de 1: 9 (p / v) a 5 °C por 5 min., utilizando um agitador de hélice (Fisatom 713D). Após homogeneização, a proteína foi submetida à solubilização alcalina em banho-maria ultra-termostático (Lauda, modelo Alpha RA-8) por 30 min, sob agitação constante com agitador de hélice (Fisatom 713D), utilizando hidróxido de sódio (NaOH) (1N) como agente alcalinizante e temperatura controlada constante de 5 °C. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada a 9.000 x g em centrífuga Nova Técnica, modelo MA 1815 a 5 °C por 15 min. para separar o produto solubilizado em três fases: lipídios, proteínas solúveis e proteínas insolúveis, facilitando assim a remoção do sobrenadante. A fase intermediária resultante da centrifugação, correspondente às proteínas solúveis, foi separada e submetida à precipitação isoelétrica, utilizando ácido clorídrico (HCl) (1N). O pH foi ajustado para 5,8 a 5 °C sob agitação constante por 30 min. Outra centrifugação foi realizada a 9.000 x g e 5 °C por 15 min. separar a fração precipitada, facilitando assim o recolhimento do precipitado e obtendo o isolado proteico. O isolado de

proteína de pescado foi seco em estufa de circulação de ar (modelo MA 035) a 40 °C por 12 h triturado em moinho de dupla lâmina. O isolado proteico foi armazenado em um recipiente de vidro hermeticamente selado à temperatura ambiente e utilizado durante o curso deste estudo.

### **3.2.2 Caracterização da proteína isolada da CMS de tilápia**

#### **3.2.2.1 Potencial isoelétrico**

Para a determinação do ponto isoelétrico da proteína, a CMS foi misturada com água destilada a 4 °C na proporção de 1:4, sob agitação constante (150 rpm). O pH foi ajustado em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, pela adição de solução de HCl 1N ou NaOH 1N. A mistura foi agitada por 20 min. após a correção do pH e centrifugada por 20 min. A amostra foi filtrada com peneira (18 mm mesh) e medida a absorbância a 595 nm utilizando-se espectrofotômetro (BIOSPECTRO). Para quantificação das proteínas foi utilizado o indicador Comassie Brilliant Blue G-250. A curva padrão foi realizada com albumina bovina.

#### **3.2.2.2 Composição proximal**

A fim de determinar a composição proximal da CMS e do isolado proteico de tilápia, as determinações de umidade, cinzas, lipídios e proteínas foram realizadas em triplicatas de acordo com a metodologia oficial (AOAC, 2000). O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico (AOAC 950.46) em estufa a 105 °C. O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC 928.08), enquanto o teor de proteína bruta foi calculado pela multiplicação pelo fator 6,25. O teor de lipídios foi determinado pelo método Soxhlet (AOAC 960.39) e o teor de cinzas bruto pelo método gravimétrico (AOAC 920.153) em forno mufla a 500-600 °C. As análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.2.2.3 Solubilidade proteica**

A solubilidade proteica foi determinada de acordo com o método proposto por Chalamaiah et al. (2010), com adaptações e variações de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Para isso, 0,5 g de amostra foram pesadas e deslocadas em béquer de 50 mL. Em seguida, 2 mL de NaCl 0,1N e 48 mL de água destilada foram adicionados. O pH foi ajustado com HCl 1N e NaOH 1N usando um potenciômetro de bancada (Instrutherm, modelo PH-2000). A dispersão foi mantida sob agitação com um agitador magnético (Tecnal, modelo TE-0851) durante 30 min. e

centrifugado a 8.667 x g durante 20 min. A solubilidade proteica foi calculada a partir da Eq. 3.1.

$$S (\%) = \frac{Q_{ps}}{Q_{pa}} \times 100 \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde: S = solubilidade em água (%);  $Q_{ps}$  = quantidade de proteína no sobrenadante;  $Q_{pa}$  = quantidade de proteína na amostra.

#### 3.2.2.4 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada de acordo com o método proposto por Regenstein et al., (1984), com base na diferença entre a massa da amostra molhada e a da amostra seca. Para isso, isolou-se a dispersão proteica a 1% com variação de pH (3, 5, 7, 9 e 11). Em seguida, 2 mL de NaCl 0,1 N foram adicionados à dispersão para obter uma suspensão homogênea e a solução tampão correspondente foi adicionada de acordo com o pH, até um volume de 40 mL. A dispersão foi mantida sob agitação durante 15 min. e centrifugada a 8.667 x g durante 20 min. As proteínas solúveis no sobrenadante foram quantificadas e descontadas da proteína total da amostra original. O sobrenadante foi descartado e os pesos molhados foram tomados. O resultado foi expresso em mL de água por grama de proteína, de acordo com a Eq. 3.2.

$$CRA = \frac{Q_{ar}}{M_{op}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde: CRA = capacidade de retenção de água;  $Q_{ra}$  = capacidade de água retida;  $M_{op}$  = massa original de proteína.

#### 3.2.2.5 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A capacidade de retenção de óleo (CRO) foi determinada de acordo com o método descrito por Fonkwe e Singh (1996). Para isso, pesaram-se 0,5 g de amostra de proteína isolada e misturou-se com 10 mL de óleo de soja em tubos de centrífuga e depois agitou-se num agitador de tubos (Phoenix, Modelo AP 56) durante 10 min. Após a mistura, foi centrifugada a

8.667 xg (Biosystems, modelo MPW-350R) por 20 min. e a diferença entre o óleo adicionado (Oa) e o óleo não retido foi considerada como a quantidade de óleo retida pelos concentrados (Or) . O resultado foi expresso como a quantidade de óleo retido (mL) por grama de proteína contida na amostra, com base na Eq. 3.3.

$$CRO = \frac{Oa - Onr}{Mp} \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde: CRO = capacidade de retenção de óleo; Oa = óleo adicionado; Onr = óleo não retido; Mp = massa da proteína.

### 3.2.2.6 Cor

A cor dos filmes foi determinada pela média de três medições, uma no centro e as outras duas no perímetro (distância da borda) usando um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Chroma Meter, Japão), operando a D65 (luz do dia).

Os parâmetros chroma a \*, chroma b \* e luminosidade (L) \* foram determinados em triplicata, sobrepondo o isolado proteico ao padrão branco. As escalas CIE-Lab foram usadas para medir a cor dos filmes, com L \* variando de 0 (preto) a 100 (branco), a \* de verde (-60) a vermelho (+60) e b \* de azul (- 60) para amarelo (+60) (KUNTE et al., 1997). A diferença de cor em relação ao padrão foi determinada usando a Eq. 3.4 (HUNTERLAB, 1997):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação 3.4}$$

### 3.2.3 Obtenção dos filmes

Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*, que consiste no espalhamento da solução formadora de filme em um molde, de acordo com o método proposto por ARDAKANI et al., (2010) e ANDRADE et al., (2017).

O isolado proteico de tilápia foi disperso em água destilada e depois aquecido a 30 °C sob agitação magnética constante (350 rpm) (Tecnal, modelo TE - 0851) por 10 min. Após a hidratação, o pH da dispersão foi ajustado para 11 com a adição de NaOH 1N utilizando um potenciômetro de bancada (modelo Quimis, São Paulo, Brasil) com agitação constante por mais 10 min. Posteriormente, a temperatura foi aumentada para 80 °C e adicionada à nanoargila.

Após completa dissolução do isolado proteico e nanoargila, o plastificante glicerol previamente solubilizado em água destilada e os óleos essenciais foram adicionados e o pH mantido em 11. Três níveis (-1, 0, +1) de concentrações foram avaliados para a proteína de isolado de tilápia, plastificante glicerol (G), óleo essencial de orégano (OEO), óleo essencial de cravo-da-índia (OEC) e nanoargila (NA) (Tabela 3.1). Subsequentemente, agitou-se a solução durante 20 min, depois filtrou-se a solução filmogênica e despejou-se 25 g da solução filmogênica nas placas de Petri de policarbonato com um diâmetro de 15 cm e foi submetida a secagem em estufa de circulação de ar forçada em uma câmara incubadora com agitação orbital (Marconi, modelo MA420) a  $40 \pm 1$  °C por 12 h. Em seguida, os filmes nanocompósitos foram armazenados por 48 h em dessecadores mantidos a  $25 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $55 \pm 2\%$ , controlados com solução saturada de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

**Tabela 3.1** Matriz de planejamento fatorial, com os valores codificados e reais para o desenvolvimento de filmes à base de isolado proteico da tilápia.

Variáveis (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Níveis		
	-1	0	+1
Isolado proteico	0,5	1,0	1,5
Glicerol	0,2	0,3	0,4
Óleo essencial de orégano	0	0,2	0,4
Óleo essencial de cravo-da-índia	0	0,2	0,4
Nanoargila	0,1	0,2	0,3

O delineamento fatorial fracionário com 5 variáveis, totalizando 19 experimentos estão representados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Delineamento fatorial fracionado  $2^{(5-1)}$  para produção de filmes.

Ensaio	Isolado proteico (1)	Glicerol (2)	Óleo essencial de orégano (3)	Óleo essencial de cravo-da-índia (4)	Nanoargila (5=1234)
1	-1 (0,5)	-1 (0,2)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	+1 (0,3)
2	+1 (1,5)	-1 (0,2)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	-1 (0,1)
3	-1 (0,5)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	+1 (0,3)
4	+1 (1,5)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	-1 (0,0)	+1 (0,3)
5	-1 (0,5)	-1 (0,2)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	-1 (0,1)
6	+1 (1,5)	-1 (0,2)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	+1 (0,3)
7	-1 (0,5)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	+1 (0,3)
8	+1 (1,5)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	-1 (0,1)
9	-1 (0,5)	-1 (0,2)	-1 (0,0)	+1 (0,4)	-1 (0,1)
10	+1 (1,5)	-1 (0,2)	-1 (0,0)	+1 (0,4)	+1 (0,3)
11	-1 (0,5)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	+1 (0,4)	+1 (0,3)
12	+1 (1,5)	+1 (0,4)	-1 (0,0)	+1 (0,4)	-1 (0,1)
13	-1 (0,5)	-1 (0,2)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	+1 (0,3)
14	+1 (1,5)	-1 (0,2)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	-1 (0,1)
15	-1 (0,5)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	-1 (0,1)
16	+1 (1,5)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	+1 (0,4)	+1 (0,3)
17	0 (1,0)	0 (0,3)	0 (0,2)	0 (0,2)	0 (0,2)
18	0 (1,0)	0 (0,3)	0 (0,2)	0 (0,2)	0 (0,2)
19	0 (1,0)	0 (0,3)	0 (0,2)	0 (0,2)	0 (0,2)

### 3.2.4 Avaliação subjetiva de filmes biopoliméricos

Os seguintes parâmetros foram determinados para os filmes usando análise visual e tátil: (a) continuidade (ausência de ruptura após secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis, bolhas de ar ou zona de opacidade) e flexibilidade (manuseio sem risco de ruptura) (GONTARD et al., 1992; MALI et al., 2005). Filmes que não possuíam tais características foram descartados.

### 3.2.5 Caracterização de filmes biopoliméricos

#### 3.2.5.1 Espessura

A espessura do filme foi medida usando um micrômetro externo (Digimes, São Paulo, Brasil). O valor final representou a média de 5 medições aleatórias feitas em diferentes partes do filme.

#### 3.2.5.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi determinada de acordo com o método proposto por GONTARD et al., 1994. Amostras de discos em triplicata com 2 cm de diâmetro foram retirados dos filmes. A matéria seca inicial das amostras foi obtida por secagem em estufa de circulação de ar forçado por 24 h a 105 °C. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipiente contendo 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação constante a 50 rpm em agitador orbital a 25 °C por 24 h (Cientec, CT-712RNT). As amostras solubilizadas foram então removidas e secas em estufa de circulação de ar forçado a 105 °C durante mais 24 h antes de determinar a matéria seca final. A solubilidade do filme foi representada pelo material solúvel total dissolvido em água, calculado de acordo com a Eq. 3.5.

$$S(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde: S = solubilidade em água (%);  $m_i$  = massa seca inicial da amostra (g);  $m_f$  = massa seca final da amostra (g).

#### 3.2.5.3 Solubilidade em ácido

A solubilidade em ácido foi determinada preparando inicialmente as amostras como descrito no item 3.2.5.2. No entanto, após a determinação da matéria seca inicial, as amostras foram imersas em um recipiente contendo ácido clorídrico (1N) por 24 h depois secas e pesadas para determinar a matéria seca final (Eq. 3.6).

$$S_a(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação 3.6}$$

Onde: Sa = solubilidade em ácido (%); mi = massa seca inicial da amostra (g); mf = massa seca final da amostra (g).

#### 3.2.5.4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada em triplicata de acordo com o método gravimétrico padrão modificado E-96 (ASTM, 2000a). Os filmes foram selados em células de alumínio de permeação com área de permeação de 0,13 m<sup>2</sup>, contendo cloreto de cálcio e selados com parafina para garantir a migração da umidade somente através da área exposta do filme. As células de permeação foram colocadas em dessecadores mantidos a 25 °C e umidade relativa de 75%. A quantidade de vapor de água que migra através do filme foi determinada a partir do ganho de massa do cloreto de cálcio, medido a cada 24 h por 7 dias (PIMENTEL et al., 2018). O efeito do espaço vazio entre a região abaixo do filme e a superfície do cloreto de cálcio das células de teste não foi considerado no cálculo (GENNADIOS et al., 1994; MCHUGH; KROCHTA, 1994). A PVA foi calculada de acordo com a Eq. 3.7.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t \times AE} \times \frac{L}{\Delta P} \quad \text{Equação 3.7}$$

Onde: PVA = permeabilidade ao vapor de água g mm dia<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>; ΔW = ganho de massa pela célula (g); L = espessura inicial do filme (mm); t = tempo de armazenamento (dias); AE = área do filme exposta (m<sup>2</sup>); ΔP = diferença de pressão parcial (kPa).

#### 3.2.5.5 Resistência à tração e alongação

A resistência à tração e a alongação na ruptura foram determinados em triplicata usando o Analisador de Textura TA-XT2 (SMS, Surrey, UK), operado de acordo com o método padrão ASTM D 882-83 (ASTM, 2000b), com modificações (TANADA-PALMU et al., 2000). Os filmes foram cortados em retângulos (8,0 cm de comprimento por 2,5 cm de largura) e fixados em garras com distância inicial até a separação de 5,0 cm. A velocidade dos testes foi fixada em 0,8 mm/s. A resistência à tração foi calculada dividindo a força máxima para a ruptura do filme pela área da seção transversal do filme (Eq. 3.8). A alongação na ruptura foi determinada dividindo-se a diferença entre a distância final percorrida até a ruptura e a distância inicial de separação pela distância inicial de separação multiplicada por 100 (Eq. 3.9).

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad \text{Equação 3.8}$$

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

$$E = \frac{(d_r - d_o)}{d_o} \times 100 \quad \text{Equação 3.9}$$

Onde: E = alongação (%); d<sub>o</sub> = separação inicial entre as garras (cm); d<sub>r</sub> = separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

### 3.2.5.6 Cor

A cor dos filmes foi determinada utilizando a mesma metodologia para o isolado proteico.

### 3.2.5.7 Opacidade

A opacidade (Y) foi determinada usando um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Chroma Meter, Japão), utilizando metodologia descrita por Sobral, (2000). As medidas foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com fundo branco (Y<sub>w</sub>) e preto (Y<sub>b</sub>). Os valores de opacidade foram calculados de acordo com a Eq. 3.10 (HUNTERLAB, 1997):

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad \text{Equação 3.10}$$

Onde: Y = opacidade do filme (%); Y<sub>p</sub> = opacidade do filme contra um fundo preto; Y<sub>b</sub> = opacidade do filme contra um fundo branco.

### 3.2.5.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes foi observada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, JSM-6060, Japão), operado a 20 kV e 50 mA. Antes do teste, as amostras foram colocadas em um suporte de alumínio e cobertas com uma fina camada de

ouro (Sputter Coater, SCDO50) para melhorar a condução térmica. Imagens foram capturadas com ampliação de 1.000 e 2.000x.

### **3.2.5.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A transição vítrea de temperaturas e as variações de entalpia de fusão dos filmes foram determinadas utilizando calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, modelo DCS 60, Osaka, Jap) com o módulo de resfriamento por nitrogênio líquido. Amostras com cerca de 6-10 mg foram hermeticamente seladas em cápsulas de alumínio e pré-condicionadas a 25 °C e 50% de umidade relativa. As medições foram realizadas em atmosfera inerte de grau cromatográfico ultra-seco a gás nitrogênio, para a mesma vazão de alimentação e arrasto de 50 mL min<sup>-1</sup>. Os testes foram iniciados a 40 °C e depois as amostras foram aquecidas a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> até atingir 200 °C.

### **3.2.5.10 Difração de raios X (DRX)**

As análises de difração de raios X foram realizadas em triplicata usando um difratômetro D500 Siemens da geometria de Bragg-Brentano com radiação Cu. As condições de análise foram: (i) Tensão e corrente: 40 kV e 17,5 mA, respectivamente; (ii) faixa de varredura: 2θ de 2 a 60°; (iii) Passo: 0,05° e (iv) Velocidade 0,6°/min (5s passo<sup>-1</sup>), provido de grafite monocromador de feixe secundário. A variação dos tamanhos dos cristais foi determinada usando o software PC - APD Diffraction. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e posteriormente analisadas.

### **3.2.5.11 Espectroscopia Infravermelha (FTIR)**

As análises de espectroscopia no infravermelho dos filmes foram realizadas em espectrometria FT-IV (Prestige 21, 210045, Japão) na região espectral de 4000-500 cm<sup>-1</sup> (XU et al., 2005).

### 3.2.5.12 Atividade antimicrobiana dos filmes (teste de difusão em ágar)

Os filmes com as melhores características de acordo com a superfície de resposta foram selecionados e tiveram sua atividade antimicrobiana testada em triplicata, utilizando a técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCL, 2003).

Filmes sem óleo essencial foram utilizados como controles negativos. As bactérias Gram (-) utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, e as Gram (+) foram *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Os inóculos de cada microrganismo foram preparados pela suspensão direta em solução salina estéril de uma alça de colônias isoladas de um meio não seletivo de PCA com as bactérias correspondentes previamente incubadas a 35 °C por 24 h. A densidade óptica das suspensões foi ajustada usando um espectrofotômetro. A absorbância da solução de McFarland a 0,5 foi avaliada de 0,08 a 0,10 a 625 nm. As placas de ágar Mueller Hinton foram inoculadas com os microrganismos, esfregando-se um cotonete de algodão estéril umedecido com a solução de inóculo. Na superfície do ágar inoculado foram colocados discos (1,5 cm de diâmetro) dos filmes, previamente esterilizados em câmara com luz UV por 3 min. As placas foram incubadas a 35 °C e após 24 h os halos de inibição foram medidos (NCCL, 2003).

### 3.2.5.13 Análise estatística

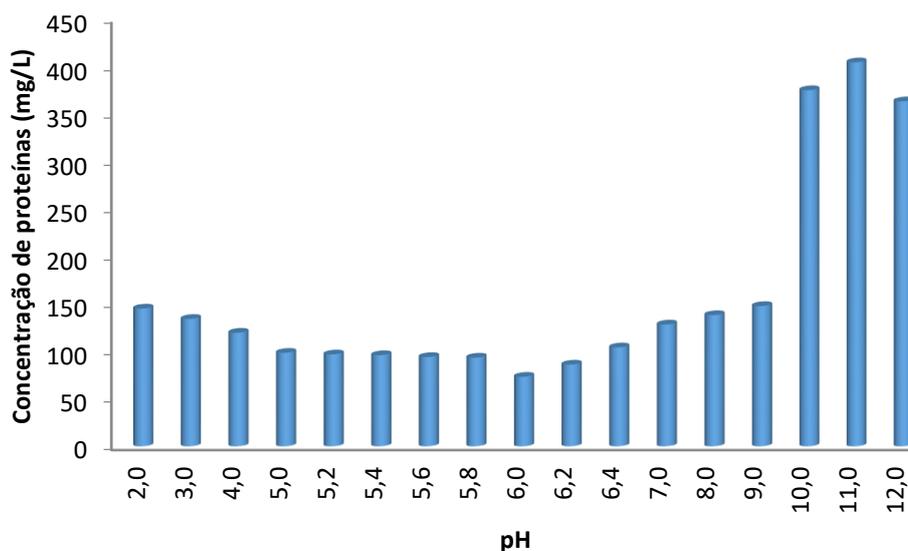
O software Statistica® 6.0 (Stasoft, EUA) foi usado para calcular a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar as diferenças entre as propriedades dos filmes na faixa de confiança de 95% usando o software Assistat. As avaliações foram realizadas a partir de dados obtidos em triplicatas e os resultados foram apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão. Para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa de variação dos dados experimentais, foi utilizado o teste F de significância. Neste teste, os valores de F estimados a partir dos dados experimentais foram comparados com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência  $F_{v_1, v_2}$ , a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para que o modelo encontrado não seja apenas estatisticamente significativo, mas também útil para fazer previsões, o valor calculado do teste F para a regressão deve ser 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado (BARROS NETO et al., 2002).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Caracterização da CMS

##### 3.3.1.1 Potencial isoelétrico

Os resultados da análise de potencial isoelétrico demonstraram que a precipitação proteica da tilápia do Nilo ocorreu em pH 6,0 (Figura 3.1). Este valor está associado ao equilíbrio na quantidade de cargas positivas e negativas. Em pH 11, as proteínas foram completamente solubilizadas. As proteínas podem ser positiva ou negativamente carregadas em um pH abaixo ou acima de seu ponto isoelétrico, respectivamente, onde a repulsão eletrostática ocorre entre as moléculas, aumentando assim a solubilização da proteína (TASKAYA et al., 2009).



**Figura 3.1** Potencial isoelétrico do isolado proteico de tilápia.

##### 3.3.1.2 Composição proximal

A carne mecanicamente separada (CMS) da tilápia do Nilo *in natura* utilizada para extração do isolado proteico apresentou valor médio de pH de  $6,6 \pm 0,05$ . Em valores de pH abaixo de 6,5, as proteínas podem sofrer desnaturação e conseqüentemente alterar sua disposição para a geleificação (CHUAYNUKUL et al., 2015). Os resultados obtidos mostraram

que a CMS permaneceu dentro da qualidade adequada, considerando a legislação brasileira que propõe um pH máximo de 6,8 para peixes in natura. A Tabela 3.3 mostra os valores médios da composição proximal de CMS de tilápia.

**Tabela 3.3** Composição proximal da CMS de tilápia do Nilo.

<b>Componente</b>	<b>(% B.U.)</b>
Umidade	70,10 ± 0,95
Cinzas	1,86 ± 0,07
Lipídios	9,21 ± 0,50
Proteínas	15,36 ± 0,55

\*Média aritmética de três repetições; B.U. = base úmida.

Yanar et al., (2006), mostram valores para CMS da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de 76,87% de umidade, 1,09% de cinza, 18,23% de proteína, no entanto, os resultados divergem para lipídios, em relação ao presente estudo, onde os mesmos encontraram valores de 2,64%. Esses resultados também são próximos aos obtidos por Rebouças et al., (2012) que encontraram valores de 77,24% de umidade, 1,02% de cinzas, 17,48% de proteínas e 4,46% de lipídios encontrados anteriormente para a tilápia. As variações observadas nesses estudos podem estar associadas à composição nutricional da tilápia, que pode variar dependendo do manejo dietético, composição da dieta, tamanho e idade dos peixes.

### **3.3.2 Caracterização do isolado proteico**

#### **3.3.2.1 Composição proximal**

O isolado proteico extraído da CMS de tilápia apresentou umidade de 0,99%, 85,15% de proteínas, 0,68% de cinzas e 10,85% de lipídios (Tabela 3.4). Estes valores são reduzidos para o conteúdo de umidade quando comparado à própria CMS. Este fato está associado ao método de extração da proteína, que passa por processo de secagem, entretanto, os valores de proteínas e lipídios foram maiores em relação à CMS. Os resultados podem ser justificados porque a maioria dos lipídios foi separada juntamente com a porção de proteínas insolúveis durante o processo de centrifugação.

**Tabela 3.4** Composição proximal do isolado proteico de CMS de tilápia.

<b>Componente</b>	<b>(% B.S.)</b>
Umidade	0,99 ± 0,64
Cinzas	0,68 ± 0,25
Lipídios	10,85 ± 0,61
Proteínas	85,15 ± 0,17

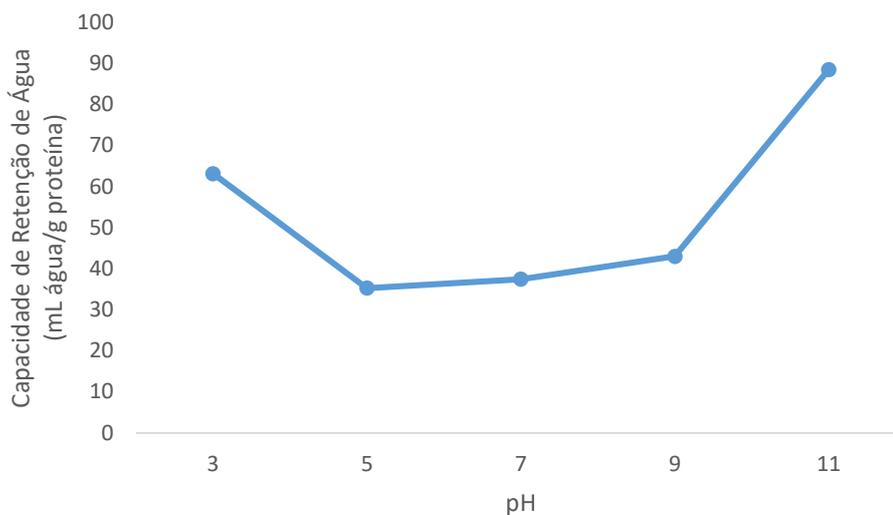
\*Média aritmética de três repetições; B.S. = base seca.

Valores de 1,38% de umidade, 2,26% de cinzas, 62,39% de proteínas e 32,63% de lipídios foram encontrados em outros trabalhos para a proteína recuperada de tilápia do Nilo (VIDAL et al., 2011). Apesar destes autores demonstrarem que a técnica de solubilização alcalina utilizada para a concentração de proteínas foi eficiente, houve também uma alta concentração de lipídios quando comparados aos resultados aqui obtidos.

### 3.3.2.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água (CRA) pode ser determinada como a disposição da carne para reter a sua água ou umidade durante a aplicação de forças externas, e aquecimento, corte, moagem e prensagem. É uma característica importante para determinar a qualidade da carne utilizada para consumo direto, assim como a carne destinada à industrialização (FLORES; BERMELL, 1984).

O resultado encontrado para a CRA para a proteína isolada da tilápia foi de 63,15% para pH 3, 35,25% para pH 5, 37,45% para pH 7, 42,98% para pH 9 e 88,50% para pH 11 (Figura 3.2). Houve uma CRA mais baixa perto do ponto isoelétrico da proteína. O processo é possível devido à diminuição da capacidade da proteína de se ligar à água, uma vez que as ligações intermoleculares e a formação de acumulações de proteína podem ser afetadas por outras propriedades como ponto isoelétrico e solubilidade. Em pH próximo a 6,0, as moléculas de água se combinam com grupos polares das proteínas causando o aumento de CRA (KELLEHER; HULTIN, 1999). Neste experimento verificou-se o inverso, onde foi observado que no pH próximo ao ponto isoelétrico a CRA diminuiu e nos pontos mais distantes, a CRA apresentou um aumento.



**Figura 3.2** Capacidade de retenção de água do isolado proteico de tilápia em função do pH.

### 3.3.2.3 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A capacidade média de retenção de óleo (CRO) obtida para o isolado de proteína de tilápia foi de 5,3 mL de óleo por grama de proteína. A retenção do óleo varia de acordo com o número de grupos hidrofóbicos expostos na proteína e provavelmente as cadeias laterais não polares das proteínas têm afinidade com as cadeias hidrofóbicas da molécula de óleo, contribuindo para a absorção e melhora dessa característica (FONTANA et al., 2009).

Valores próximos e divergentes foram encontrados, respectivamente, para a CRO obtida de proteínas isoladas de subprodutos da anchova (*Engraulis anchoita*) usando o método de solubilização alcalina - 7,27 mL de óleo por grama de proteína (FREITAS et al., 2011) e proteína isolada de polaca do alasca (*Theragra chalcogramma*) - 3,5 mL de óleo por grama de proteína (SATHIVEL; BECHTEL, 2006).

### 3.3.2.4 Cor

O isolado de proteína mostrou coloração escura. Esta declaração é baseada no menor valor obtido para o parâmetro  $L^*$  (46,52). No entanto, apresentou maior tendência para o amarelo 13,66 (parâmetro  $b^*$ ), provavelmente devido ao fato dos pigmentos da pele serem possivelmente arrastados durante a solubilização da proteína. A coloração mais intensa do concentrado é atribuída ao alto conteúdo lipídico.

### 3.3.3 Obtenção e avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos

Os parâmetros de avaliação subjetiva (GONTARD et al., 1992) foram usados para analisar visualmente algumas características dos filmes isolados de proteína de tilápia (Tabela 3.5).

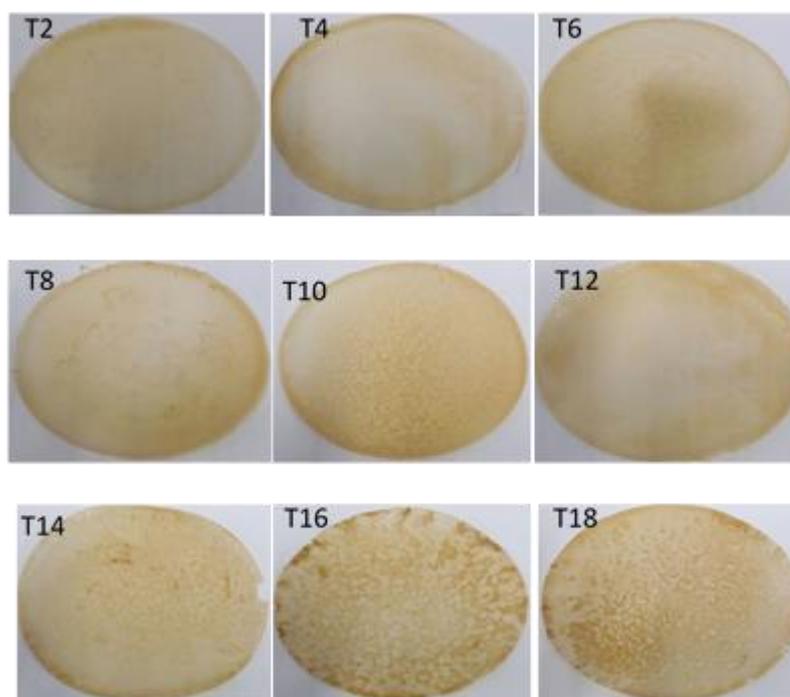
**Tabela 3.5** Avaliação subjetiva dos filmes de isolado proteico de tilápia.

Tratamentos	Variáveis independentes* (g/100mL)					Características**		
	IP	GLI	OO	OC	NA	C	H	M
1	0,5	0,2	0	0	0,3	xx	xxx	x
2	1,5	0,2	0	0	0,1	xxx	xxx	xxx
3	0,5	0,4	0	0	0,3	xx	xxx	xx
4	1,5	0,4	0	0	0,3	xxx	xxx	xxx
5	0,5	0,2	0,4	0	0,1	xx	xxx	x
6	1,5	0,2	0,4	0	0,3	xxx	xxx	xxx
7	0,5	0,4	0,4	0	0,3	xx	xxx	x
8	1,5	0,4	0,4	0	0,1	xxx	xxx	xxx
9	0,5	0,2	0	0,4	0,1	xx	xxx	x
10	1,5	0,2	0	0,4	0,3	xxx	xxx	xxx
11	0,5	0,4	0	0,4	0,3	xx	xxx	x
12	1,5	0,4	0	0,4	0,1	xxx	xxx	xxx
13	0,5	0,2	0,4	0,4	0,3	xx	xxx	x
14	1,5	0,2	0,4	0,4	0,1	xxx	xxx	xxx
15	0,5	0,4	0,4	0,4	0,1	xx	xxx	x
16	1,5	0,4	0,4	0,4	0,3	xxx	xx	xxx
17	1	0,3	0,2	0,2	0,2	xxx	xx	xxx
18	1	0,3	0,2	0,2	0,2	xxx	xx	xxx
19	1	0,3	0,2	0,2	0,2	xxx	xx	xxx

Onde: \* IP = isolado proteico de tilápia, GLI = Glicerol, OO = óleo essencial de orégano, OC = óleo essencial de cravo-da-índia, NA = nanoargila \*\*C = continuidade, H = homogeneidade, M = Manuseabilidade, xxx: excelente, xx: bom, x: deficiente.

Os filmes proteicos de tilápia com concentração de isolado proteico de 1,5 e 1,0g/100mL foram contínuos no aspecto de homogeneidade, sem rachaduras ou rupturas após o processo de secagem. Eles não apresentaram partículas insolúveis visíveis a olho nu. No entanto, verificou-se que os filmes contendo a menor concentração de isolado proteico, obtidos a partir dos

tratamentos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15, apresentaram falta de continuidade e manuseio, dificultando sua remoção das placas de Petri e análise devido a sua baixa espessura, tornando os filmes frágeis. Esses filmes que apresentaram resultados insatisfatórios para continuidade e manuseio não foram utilizados nos próximos estágios de caracterização. Os filmes derivados dos demais tratamentos poderiam ser manipulados sem risco de ruptura e não apresentavam dificuldade de serem removidos das placas (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Filmes biopoliméricos de isolado proteico de tilápia selecionados para caracterização.

Legenda: T2 (1,5g de IP, 0,2g de GLI e 0,1g de NA), T4 (1,5g de IP, 0,4g de GLI e 0,3g de NA), T6 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO e 0,3g de NA), T8 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO e 0,1g de NA), T10 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OC e 0,3g de NA), T12 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OC e 0,1g de NA), T14 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,1g de NA), T16 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,3g de NA) e T18 (1,0g de IP, 0,3g de GLI, 0,2g de OO, 0,2g de OC e 0,2g de NA).

Observou-se que os filmes produzidos em placas de policarbonato foram removidos com mais facilidade e ficaram intactos após o processo, comparados aos filmes preparados em placas de vidro. Em geral, todos os filmes eram amarelados e apresentavam bom aspecto. A

elaboração de filmes através da metodologia de *casting* produz filmes com diferentes espessuras, variando de acordo com a massa aplicada em sua preparação (MALI et al., 2005).

### 3.3.4 Caracterização dos filmes biopoliméricos

Os resultados do planejamento experimental para espessura, solubilidade em água, solubilidade em ácido, permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongamento são apresentados na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6** Caracterização dos filmes de isolado proteico de tilápia.

Ensaio	ES* (mm)	S* (%)	SA* (%)	PVA* (g mm dia <sup>-1</sup> kPa <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	RT* (MPa)	E* (%)
T2	0,08 ± 0,011 <sup>ab</sup>	64,63 ± 4,47 <sup>b</sup>	22,4 ± 3,97 <sup>cd</sup>	4,02 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,07 ± 0,32 <sup>a</sup>
T4	0,09 ± 0,014 <sup>ab</sup>	85,45 ± 3,18 <sup>a</sup>	36,11 ± 1,29 <sup>b</sup>	3,85 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,58 <sup>abc</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>d</sup>
T6	0,08 ± 0,005 <sup>ab</sup>	67,49 ± 4,25 <sup>b</sup>	20,23 ± 3,53 <sup>de</sup>	2,98 ± 0,87 <sup>ab</sup>	2,54 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,10 <sup>d</sup>
T8	0,10 ± 0,005 <sup>ab</sup>	30,62 ± 2,39 <sup>d</sup>	24,81 ± 1,62 <sup>cd</sup>	2,56 ± 0,46 <sup>ab</sup>	1,17 ± 0,46 <sup>cd</sup>	1,95 ± 0,01 <sup>a</sup>
T10	0,09 ± 0,010 <sup>ab</sup>	65,47 ± 2,16 <sup>b</sup>	13,19 ± 2,83 <sup>e</sup>	2,38 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,21 ± 0,40 <sup>abc</sup>	0,29 ± 0,20 <sup>d</sup>
T12	0,07 ± 0,011 <sup>b</sup>	53,55 ± 3,06 <sup>c</sup>	34,77 ± 2,76 <sup>b</sup>	3,14 ± 0,60 <sup>ab</sup>	2,25 ± 0,31 <sup>ab</sup>	1,22 ± 0,05 <sup>b</sup>
T14	0,08 ± 0,013 <sup>ab</sup>	39,14 ± 2,56 <sup>d</sup>	13,40 ± 0,65 <sup>e</sup>	2,75 ± 0,74 <sup>ab</sup>	2,41 ± 0,42 <sup>ab</sup>	0,48 ± 0,08 <sup>cd</sup>
T16	0,11 ± 0,009 <sup>a</sup>	54,11 ± 2,11 <sup>c</sup>	45,92 ± 3,01 <sup>a</sup>	3,19 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,36 ± 0,41 <sup>bcd</sup>	0,93 ± 0,24 <sup>bc</sup>
T18	0,06 ± 0,009 <sup>c</sup>	60,78 ± 2,12 <sup>bc</sup>	30,21 ± 4,69 <sup>bc</sup>	3,75 ± 0,48 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,18 <sup>d</sup>	0,65 ± 0,12 <sup>cd</sup>

\*Média de três repetições ± desvio padrão. Onde ES = espessura; S = solubilidade em água; SA = solubilidade em ácido; PVA = permeabilidade ao vapor de água; RT = resistência à tração; E = alongamento. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), com a finalidade de testar a adequacidade do modelo para as variáveis solubilidade em água (S), solubilidade em ácido (SA), permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração (RT) e alongamento (E). Os valores obtidos em todos os experimentos foram fixados no ponto central (0). Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 3.7 e 3.8.

**Tabela 3.7** Efeitos estimados de fatores nas respostas experimentais solubilidade em água, solubilidade em ácido, permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongação.

Variável	Fator	Efeito (U/mL)	Erro padrão	p
Solubilidade em água	Média	69,82	0,071	0,000001
	X <sub>1</sub> (IP)	-29,47	0,142	0,000023
	X <sub>2</sub> (GLI)	-8,53	0,148	0,000302
	X <sub>3</sub> (OO)	-15,66	0,148	0,000090
	X <sub>4</sub> (OC)	-5,73	0,148	0,000669
	X <sub>5</sub> (NA)	18,47	0,148	0,000064
Solubilidade em ácido	Média	28,43	0,028	0,000001
	X <sub>1</sub> (IP)	-4,33	0,057	0,000186
	X <sub>2</sub> (GLI)	18,02	0,60	0,000011
	X <sub>3</sub> (OO)	-0,91	0,060	0,004355
	X <sub>4</sub> (OC)	0,81	0,060	0,005417
	X <sub>5</sub> (NA)	4,81	0,060	0,000158
Permeabilidade ao de vapor	Média	4,71	0,014	0,000010
	X <sub>1</sub> (IP)	-1,99	0,029	0,000214
	X <sub>2</sub> (GLI)	-0,06	0,030	0,0159934
	X <sub>3</sub> (OO)	0,25	0,030	0,014576
	X <sub>4</sub> (OC)	1,05	0,030	0,000856
	X <sub>5</sub> (NA)	0,27	0,030	0,012553
Resistência à tração	Média	1,37	0,001	0,000002
	X <sub>1</sub> (IP)	1,44	0,003	0,000007
	X <sub>2</sub> (GLI)	-0,77	0,004	0,000028
	X <sub>3</sub> (OO)	-0,44	0,004	0,000085
	X <sub>4</sub> (OC)	-0,06	0,004	0,003638
	X <sub>5</sub> (NA)	-0,11	0,004	0,001314

p<0,05 indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IP= isolado proteico; GLI = glicerol; OO = óleo essencial de orégano; OC = óleo essencial de cravo-da-índia; NA = nanoargila.

**Tabela 3.7** Efeitos estimados de fatores nas respostas experimentais solubilidade em água, solubilidade em ácido, permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongação (continuação).

Variável	Fator	Efeito (U/mL)	Erro padrão	p
Elongação	Média	0,81	0,015	0,0003
	X <sub>1</sub> (IP)	0,22	0,031	0,0193
	X <sub>2</sub> (GLI)	0,37	0,032	0,0075
	X <sub>3</sub> (OO)	-0,02	0,032	0,6026
	X <sub>4</sub> (OC)	-0,39	0,032	0,0069
	X <sub>5</sub> (NA)	-0,91	0,032	0,0012

$p < 0,05$  indica variável significativa a 95% de confiança. Onde: IP= isolado proteico; GLI = glicerol; OO = óleo essencial de orégano; OC = óleo essencial de cravo-da-índia; NA = nanoargila.

Para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais, utilizou-se o teste F de significância. Neste teste, comparou-se os valores de F estimados a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência  $F_{v_1, v_2}$ , ao nível de significância de 5% ( $p = 0,05$ ).

Para que o modelo encontrado não seja apenas estatisticamente significativo, mas que também seja útil para fazer previsões o valor calculado do teste F para a regressão deve ser de 4 a 5 vezes maior que o valor tabelado (BARROS NETO et al., 1996).

**Tabela 3.8** Verificação da validade estatística do modelo para solubilidade em água (S), solubilidade em ácido (SA), permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração (RT) e alongação (E) de filmes de isolado proteico.

Variável	Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Solubilidade em água	Regressão	3.423,68	8	427,96	10.699	19,37
	Resíduos	0,08	2	0,04		
	Total	3.423,76	10			
Solubilidade em ácido	Regressão	961,69	8	120,21	17.172,85	19,37
	Resíduos	0,015	2	0,007		
	Total	961,71	10			
Permeabilidade ao vapor de água	Regressão	12,95	8	1,62	810,0	19,37
	Resíduos	0,004	2	0,002		
	Total	12,96	10			
Resistência à tração	Regressão	6,72	8	0,84	28.000	19,37
	Resíduos	0,00006	2	0,00003		
	Total	6,73	10			
Alongação	Regressão	3,48	8	0,43	215,0	19,37
	Resíduos	0,004	2	0,002		
	Total	3,48	10			

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

### 3.3.4.1 Espessura

A espessura do filme depende diretamente de sua formulação e dos parâmetros de processamento. Seu controle é necessário para manter as características de uniformidade, repetibilidade das medidas e validade das comparações entre as propriedades, além de interferir nas propriedades mecânicas dos filmes.

Os resultados variaram de 0,06 a 0,11 mm entre os tratamentos (Tabela 3.6). Essa variação de espessura e a heterogeneidade exibida por esses materiais são responsáveis pelas diferentes respostas em relação à análise mecânica. Os valores de espessura foram próximos ao encontrado para filmes de amido de ervilha, variando de 0,055 a 0,098 mm para tratamentos com 3% de amido ou 5% de amido e 20% de glicerol, respectivamente (MATTA JUNIOR et al., 2011). Para filmes preparados a partir de 5% de amido de milho lipofílico, gelatina e sorbitol como plastificante, foi observada uma espessura média de 0,0451 mm (FAKHOURI et al., 2009). A força de perfuração, a permeabilidade ao vapor de água, a diferença de cor e a opacidade do filme aumentam linearmente com a espessura dos corpos de prova (SOBRAL, 2000).

Em seu trabalho, Fakhouri et al., (2009) apresentou uma espessura média de 0,035 mm para filmes preparados a partir de 5% de amido de milho lipofílico, gelatina e sorbitol, tendo este último a função de plastificante. Esse valor está abaixo dos resultados obtidos neste trabalho.

#### **3.3.4.2 Solubilidade em água**

A solubilidade em água é uma propriedade extremamente relevante para filmes comestíveis, seja para proteção de alimentos, quando a atividade de água é alta, ou para filmes expostos à água durante o processamento de alimentos embalados (GONTARD et al., 1992). Para determinadas aplicações de filmes, é necessário que sejam até mesmo insolúveis em água para manter a integridade do produto a ser protegido (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2000). A solubilidade em água obtida variou entre 39,14% e 85,45% (Tabela 5). Pode-se observar que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). A menor solubilidade foi observada no tratamento 8 e a mais alta no tratamento 4, quanto maior o teor de componentes hidrofílicos no material, maior a solubilidade na água (Fakhouri et al., 2012).

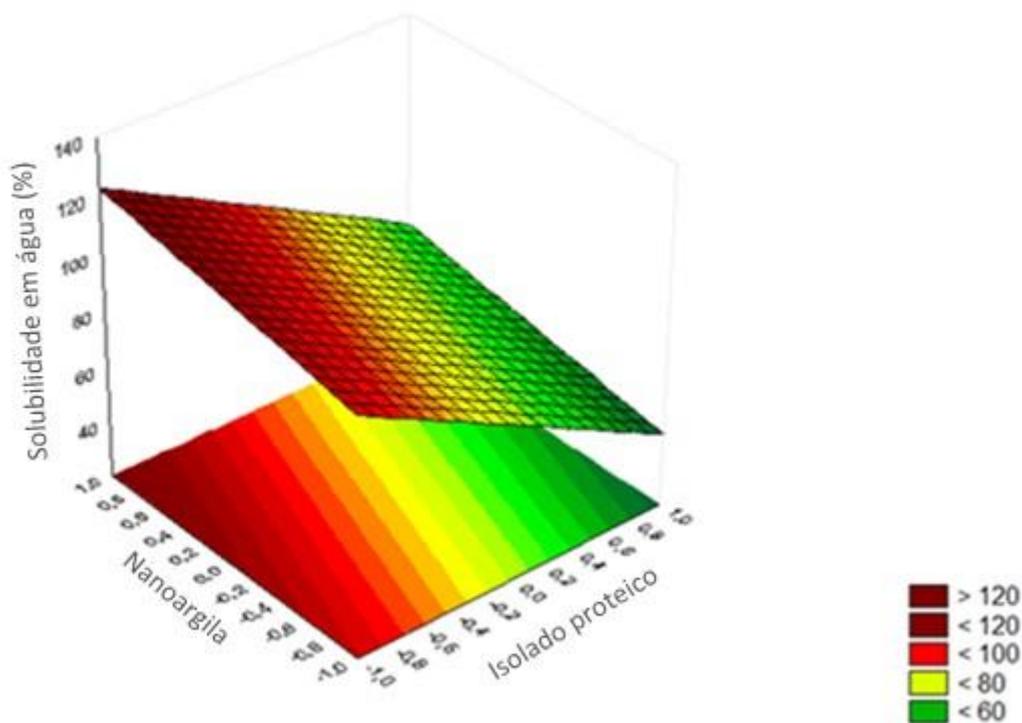
Alguns autores, ao avaliar filmes baseados em proteínas miofibrilares da tilápia do Nilo, obtiveram valores de solubilidade em água variando de 12,3% a 19,5%. Esses valores foram atribuídos ao uso de frações proteicas de alto peso molecular (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). Nakashima et al., (2016), ao avaliar filmes de colágeno com a adição de óleo essencial de cravo-da-índia, encontraram valores de solubilidade em água variando de 2,14% a 11,17%. Todos esses valores são inferiores aos encontrados neste estudo.

Entre os principais efeitos, o isolado proteico e a nanoargila foram os parâmetros que mais influenciaram na solubilidade em água ( $p < 0,05$ ). Contudo, a influência do isolado de proteína foi negativa (Tabela 3.7).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a adequação do modelo para a variável solubilidade em água (S) (Tabela 3.8). O modelo para a solubilidade de filmes proteicos isolados (Eq. 3.11) foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e preditivo ( $F_{\text{calculado}}$  foi 552,35 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ ).

$$S = 981.83 - 206.32X_1 - 57.50X_2 - 105.55X_3 - 38.63X_4 + 124.52X_5 \quad \text{Eq. 3.11}$$

( $R^2 = 0.9999$ )



**Figura 3.4** Superfície de resposta da solubilidade em água dos filmes proteicos, em função das concentrações de isolado proteico e nanoargila.

A superfície de resposta permite a visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes proteicos, expondo os valores de solubilidade, em função do isolado proteico e da nanoargila (Figura 3.4). Como mostrado pela superfície de resposta (Figura 3, Tabela 7), as solubilidades dos filmes foram influenciadas pela concentração de nanoargila e

pelos efeitos de sua interação com o isolado proteico. Pode-se observar que quanto menor a concentração de isolado e maior concentração de nanoargila, maior será a solubilidade em água (Figura 3.4).

A análise da superfície de resposta (Figura 3.4) demonstrou que a solubilidade em água dos filmes proteicos de tilápia, foi influenciada pela concentração da nanoargila, pode-se observar que o aumento desta variável proporcionou um aumento na solubilidade.

### 3.3.4.3 Solubilidade em ácido

Os valores encontrados para a solubilidade ácida mostraram que as amostras variaram entre 13,19% e 45,92% (Tabela 3.6). Pode-se observar que os filmes não sofreram influência significativa ( $p > 0,05$ ) entre as variáveis. O tratamento 16 apresentou a maior solubilidade em ácido. Este fato pode estar associado a uma maior interação polimérica entre as matrizes quando uma maior concentração de todos os componentes foi adicionada à solução filmogênica.

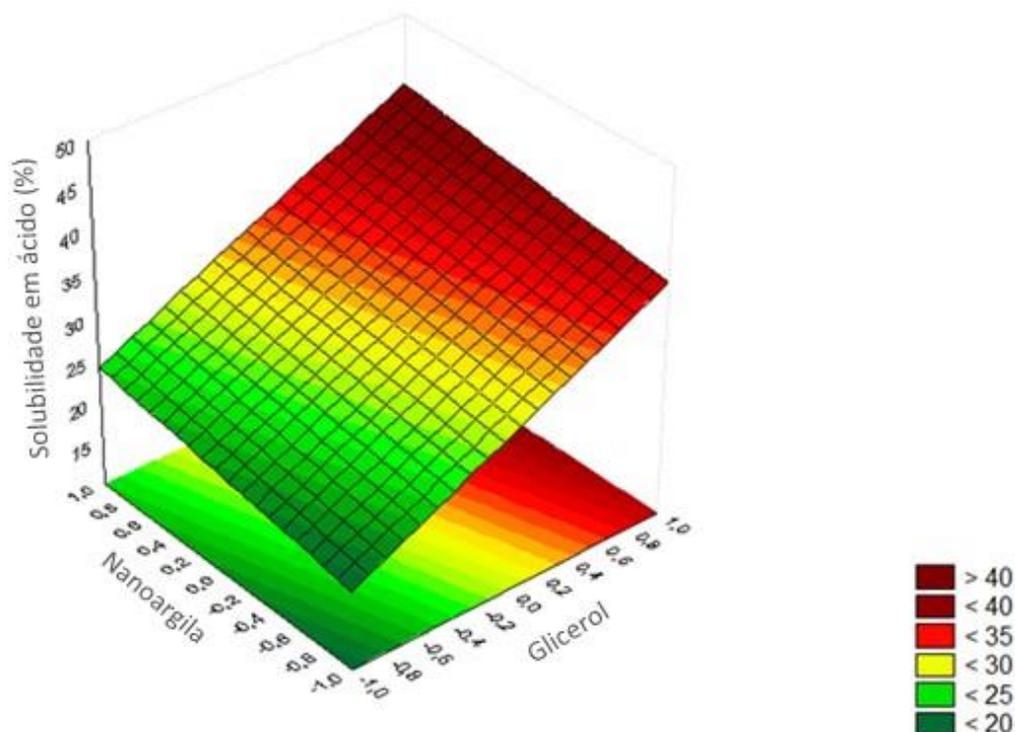
O glicerol foi a variável que mais influenciou no aumento da solubilidade em ácido ( $p < 0,05$ ). Assim, ao passar do nível inferior para o superior, houve um aumento de 18,02% na solubilidade em ácido (Tabela 3.7).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a adequação do modelo para a variável solubilidade ácida (SA) (Tabela 3.8). O modelo para a solubilidade ácida de filmes proteicos isolados (Eq. 3.12) foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e preditivo ( $F_{\text{calculado}}$  foi 886,57 vezes menor que o  $F_{\text{tabelado}}$ ).

$$SA = 981,55 - 73,36X_1 + 298,31X_2 - 15,10X_3 + 13,53X_4 + 79,65X_5 \quad \text{Eq. 3.12}$$

( $R^2 = 0,9999$ )

A superfície de resposta para solubilidade em ácido é apresentada em função do óleo essencial de cravo-da-índia e nanoargila. Pode-se observar que houve maior solubilidade ao utilizar concentrações mais elevadas de ambas as variáveis (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Superfície de resposta da solubilidade ácida dos filmes proteicos, em função das concentrações de nanoargila e glicerol.

#### 3.3.4.4 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água é um atributo utilizado para reconhecer possíveis formas de transferência de massa e interações entre os solutos e polímeros nos filmes biodegradáveis (SOUZA et al., 2011). Ela aumenta com a adição de proteínas na solução formadora de filme, estando diretamente relacionada ao número de grupos polares disponíveis nas cadeias proteicas (DI PIERRO et al., 2006).

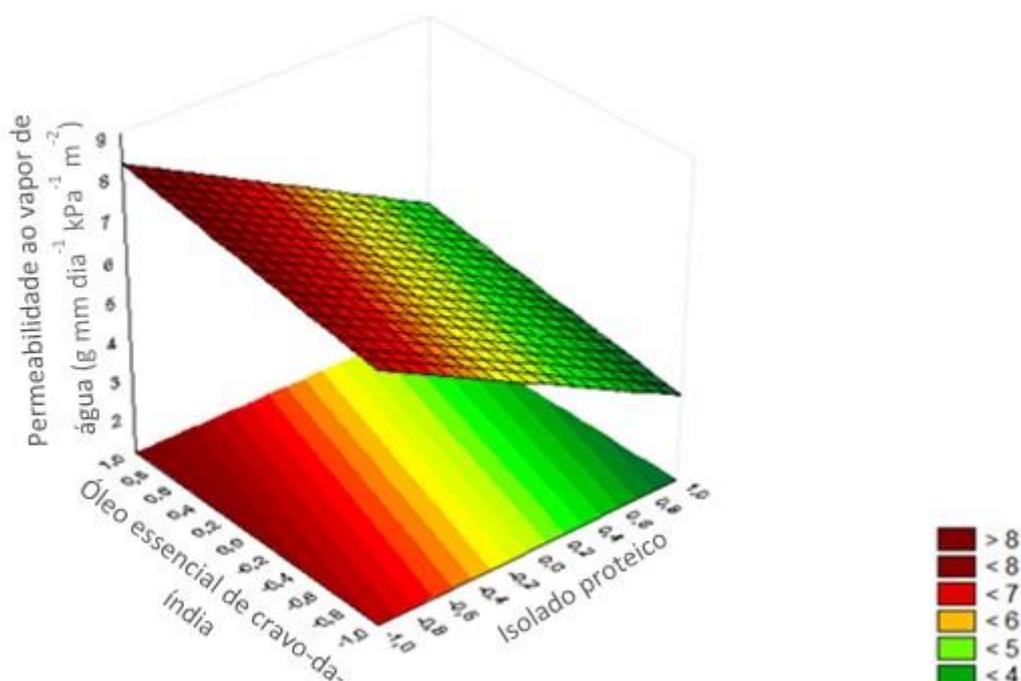
Os resultados obtidos para a permeabilidade ao vapor de água são mostrados na Tabela 3.6. Os valores encontrados para a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes da proteína tilápia no presente estudo variaram de 2,38 a 4,02 g mm d<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>, não apresentando diferença significativa entre as variáveis dos experimentos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3.6). Permeabilidades de vapor de água variando de 6,8 a 9,2 g mm kPa<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> foram relatadas em outros estudos para filmes preparados com proteína de peixe e glúten de trigo (NOGUEIRA; MARTINS, 2018), enquanto que valores de 0,77 e 4,99 g mm kPa<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> encontrados para filmes de colágeno adicionados de óleo essencial de cravo-da-índia por Nakashima et al., (2016), estão similares aos valores obtidos neste trabalho.

O óleo essencial de cravo-da-índia foi a variável que mais influenciou no aumento da permeabilidade ao vapor de água ( $p < 0,05$ ). Isto significa que, aumentando o óleo essencial de cravo-da-índia, aumenta a permeabilidade ao vapor de água em  $1,05 \text{ g mm kPa}^{-1} \text{ dia}^{-1} \text{ m}^{-2}$ . Embora a nanoargila seja reconhecida por criar estruturas em camadas, o que impede a transmissão de vapor de água através da matriz do filme ou atrasos à difusão do vapor de água devido à tortuosidade das vias (SORRENTINO et al., 2006), aqui apresentou um efeito inferior ao observado para óleo essencial de cravo-da-índia. Finalmente, o glicerol foi a variável com menor influência na permeabilidade ao vapor de água em relação aos principais efeitos (Tabela 3.7).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a adequação do modelo para a variável permeabilidade ao vapor de água (PVA) (Tabela 3.8). O modelo para a permeabilidade ao vapor de água de filmes de isoado proteico (Eq. 3.12) foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e preditivo ( $F_{\text{calculado}}$  foi 41,81 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ ).

$$\text{PVA} = 320.01 - 68.32X_1 - 2.19X_2 + 8.19X_3 + 34.14X_4 + 8.84X_5 \quad \text{Eq. 3.12}$$

( $R^2 = 0.9997$ )



**Figura 3.6** Superfície de resposta da permeabilidade ao vapor de água dos filmes proteicos de tilápia em função das concentrações de isolado proteico e óleo essencial de cravo-da-índia.

A superfície de resposta para a permeabilidade ao vapor de água é apresentada em função do isolado proteico e do óleo essencial de cravo-da-índia. Pode-se observar que houve maior permeabilidade a baixas concentrações de isolado proteico e maiores concentrações de óleo essencial de cravo-da-índia (Figura 3.6).

### 3.3.4.5 Resistência à tração

Os filmes devem ter propriedades mecânicas apropriadas, incluindo resistência à tração e alongação até a ruptura, a fim de manter a integridade constante do alimento durante o manuseio e armazenamento (GHASEMLOU et al., 2011). Os valores de resistência à tração aqui obtidos variaram entre 0,65 e 2,76 MPa, apresentando uma influência significativa entre os tratamentos (Tabela 3.6).

Comparando esses resultados com outros filmes à base de proteína de peixe, foi relatado em outros trabalhos resistência à tração entre 7,2 e 10,7 MPa para corvina (*Micropogonias furnieri*) (CORTEZ-VEGA et al., 2013), de 8,8 MPa para corvina argentina (*Umbrina canosai*) (ROCHA et al., 2014) e entre 1,11 e 3,9 MPa para filmes isolados de proteína de anchoita (*Engraulis anchoita*) (ROCHA et al., 2013). Assim, estas variações podem estar relacionadas com diferenças nas matérias-primas, resultando em isolados proteicos com composições variadas de aminoácidos.

Além disso, a resistência à tração dos filmes também depende das características do material formador do filme e da coesão da estrutura da matriz polimérica (GONTARD et al., 1994). Por exemplo, filmes com características heterogêneas apresentam uma descontinuidade na estrutura da rede, o que provoca maior fragilidade do filme, devido a pontos mais suscetíveis à quebra, reduzindo a resistência à tração, o que pode ter influenciado os resultados deste trabalho (DEBEAUFORT; VOILLEY, 1997).

O isolado proteico da tilápia do Nilo apresentou efeito positivo na resistência à tração. Assim, a variação da proteína do nível mais baixo para o nível superior representa um aumento de 1,44 MPa na resistência à tração (Tabela 3.7). Esse efeito é explicado pelo fato de que, quando a proteína é adicionada aos filmes, a quantidade de grupos sulfeto aumenta, o que aumenta o número de ligações covalentes na matriz filmogênica e, conseqüentemente, provoca a obtenção de filmes mais resistentes (PÉREZ GAGO; KROCHTA, 2001). No entanto, foi a única variável que apresentou efeito positivo sobre a resistência à tração (Tabela 3.7). Assim, é provável que a influência negativa das outras variáveis possa ter diminuído o papel do isolado

proteico na resistência dos filmes quando combinados para formar uma estrutura filmogênica heterogênea (GONTARD et al., 1994; DEBEAUFORT; VOILLEY, 1997).

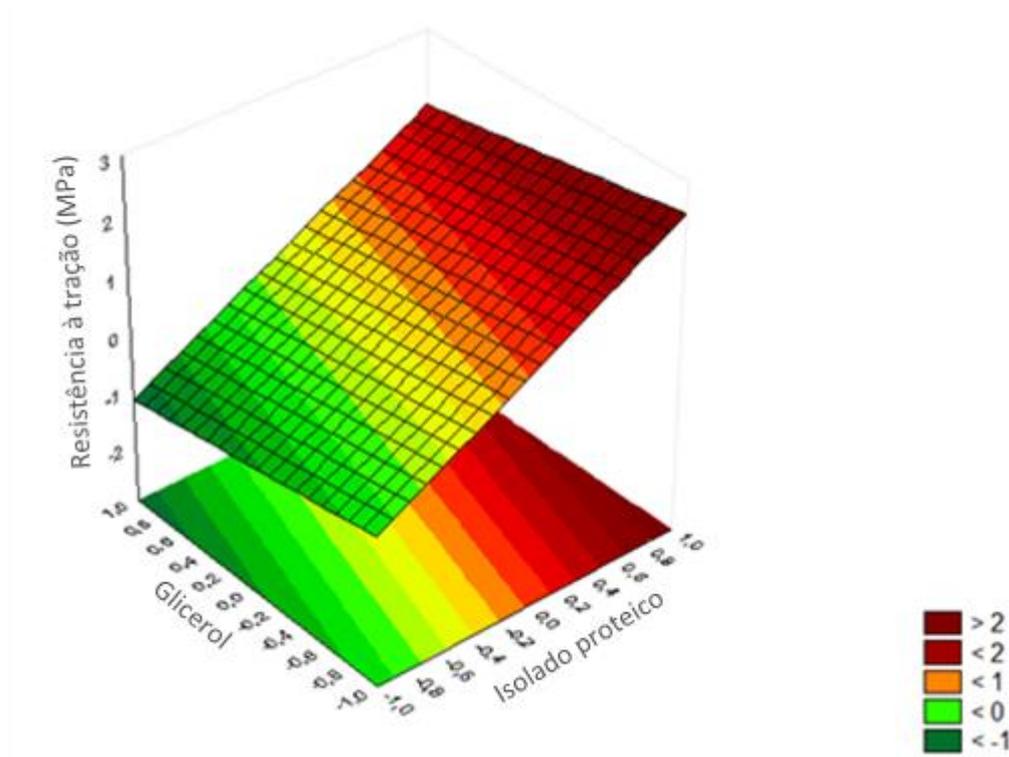
A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a adequação do modelo para a resistência à tração variável (RT) (Tabela 3.8). O modelo para a resistência à tração dos filmes isolados de proteína (Eq. 3.13) foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e preditivo ( $F_{\text{calculado}}$  foi 1,445.53 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ ).

$$RT = 700.47 + 369.58X_1 - 190.44X_2 - 018.39X_3 - 16.53X_4 - 27.55X_5 \quad \text{Eq. 3.13}$$

$$(R^2 = 0.9999)$$

A superfície de resposta para resistência à tração é apresentada como uma função de isolado proteico e glicerol. Pode-se observar que quanto maior o teor de proteína e menor o teor de glicerol, maior é a resistência à tração (Figura 3).

A Figura 3.7 apresenta a superfície de resposta, que permite uma visualização das condições do processo de desenvolvimento de filmes proteicos, expondo valores de resistência à tração, em função do isolado proteico e o glicerol.



**Figura 3.7** Superfície de resposta da resistência à tração dos filmes proteicos de tilápia em função das concentrações de isolado proteico e glicerol.

### 3.3.4.6 Elongação

Em relação aos valores de alongação, os filmes mostraram uma variação entre 0,29 e 2,07% (Tabela 3.6). Esses intervalos são inferiores aos reportados para filmes preparados com isolado proteico de anchoita, atingindo 9,0% sem a incorporação de aditivos (ROCHA et al., 2014). Esses compostos combinados com a proteína de pescado podem aumentar o alongamento (CORTEZ-VEGA et al., 2013; ROCHA et al., 2014; NOGUEIRA; MARTINS, 2018).

Mudanças nas propriedades de alongação indicam alterações na organização tridimensional, delineando a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares que ocorrem na organização da rede proteica que forma o filme, com o aumento do volume vazio e a mobilidade da cadeia (GALIETTA et al., 1998).

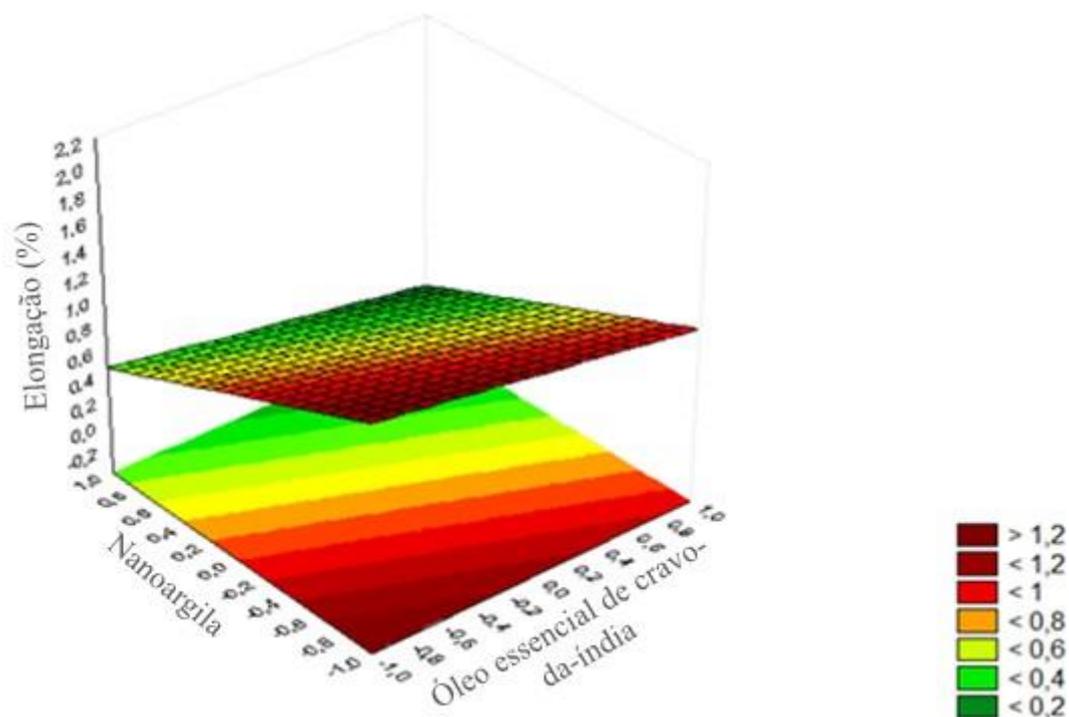
De acordo com a análise dos efeitos, a nanoargila foi o parâmetro que apresentou maior influência na alongação, quando considerados os principais efeitos ( $p < 0,05$ ). No entanto, a influência da nanoargila foi negativa (Tabela 3.7), indicando que a redução desse componente pode aumentar a alongação dos filmes de proteína da tilápia do Nilo.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a adequação do modelo para a variável alongação (E) (Tabela 3.8). O modelo para a alongação dos filmes isolados de proteína (Eq. 3.14) foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e preditivo ( $F_{\text{calculado}}$  foi 11,10 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ ).

$$E = 52.07 + 7.08X_1 + 11.48X_2 - 11.94X_3 - 28.01X_4 \quad \text{Eq. 3.14}$$

( $R^2 = 0.9987$ )

A superfície de resposta para alongação é apresentada em função do óleo essencial de cravo-da-índia e nanoargila. Pode-se observar que a redução na concentração de nanoargila e aumento na concentração de óleo essencial de cravo influenciou no aumento da alongação, (Figura 3.8).



**Figura 3.8** Superfície de resposta entre os componentes da elongação dos filmes proteicos em função das concentrações de nanoargila e óleo essencial de cravo-da-índia.

### 3.3.4.7 Cor e opacidade

A cor dos filmes pode influenciar a aceitação para fins comestíveis e não comestíveis. A opacidade dos filmes é resultado da morfologia ou estrutura química associada à massa molecular do material. Esta característica deve ser levada em conta, uma vez que a transparência dos filmes é um aspecto importante para a aceitação do consumidor (CHEN, 1995).

Os resultados mostraram uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta E^*$ ) dos filmes de isolado proteico (Tabela 3.9). Os filmes podem ser considerados de alta coloração ( $\Delta E^* > 4$ ), o que pode estar associado à variação da composição de seus componentes (isolado proteico, glicerol, nanoargila, óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano). Os valores do parâmetro  $a^*$  próximo a 0 indicam que os filmes tiveram pouca tendência a uma cor esverdeada, pois quanto maior o valor negativo do parâmetro, mais ele tende a verde. O parâmetro  $b^*$  indica que todos os filmes apresentaram cor tendendo ao amarelo, típico do colágeno.

**Tabela 3.9** Resultados de cor dos filmes desenvolvidos a partir de resíduos de tilápia.

Tratamento	L*	Chroma a*	Chroma b*	Opacidade*	$\Delta E^*$
2	87,20 ± 1,04 <sup>ab</sup>	0,35 ± 0,14 <sup>b</sup>	19,91 ± 2,18 <sup>d</sup>	16,97 ± 0,63 <sup>c</sup>	89,53 ± 1,02
4	86,53 ± 1,80 <sup>ab</sup>	0,29 ± 0,08 <sup>b</sup>	20,87 ± 2,18 <sup>d</sup>	19,12 ± 1,47 <sup>b</sup>	89,06 ± 1,40
6	79,22 ± 0,24 <sup>c</sup>	2,30 ± 0,08 <sup>a</sup>	28,65 ± 0,10 <sup>ab</sup>	33,31 ± 4,19 <sup>a</sup>	84,36 ± 2,10
8	83,42 ± 1,62 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,66 <sup>b</sup>	26,24 ± 0,91 <sup>bc</sup>	18,75 ± 3,66 <sup>b</sup>	87,30 ± 2,05
10	85,16 ± 1,08 <sup>ab</sup>	0,91 ± 0,24 <sup>b</sup>	23,57 ± 1,00 <sup>cd</sup>	24,76 ± 4,18 <sup>b</sup>	88,40 ± 1,09
12	86,75 ± 1,08 <sup>ab</sup>	0,55 ± 0,34 <sup>b</sup>	23,50 ± 2,06 <sup>cd</sup>	17,81 ± 1,21 <sup>b</sup>	89,91 ± 0,79
14	78,80 ± 0,96 <sup>c</sup>	2,97 ± 0,30 <sup>a</sup>	32,10 ± 0,69 <sup>a</sup>	20,99 ± 2,86 <sup>b</sup>	85,16 ± 1,18
16	76,35 ± 1,98 <sup>c</sup>	2,28 ± 0,56 <sup>a</sup>	30,73 ± 0,68 <sup>ab</sup>	23,43 ± 3,81 <sup>b</sup>	82,37 ± 1,95
18	88,04 ± 1,60 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,28 <sup>b</sup>	20,19 ± 2,56 <sup>d</sup>	18,37 ± 1,00 <sup>b</sup>	90,39 ± 1,18

\*Média de 3 repetições ± desvio padrão.

A luminosidade pode ser verificada na faixa de 100 (branco) a zero (preto), que o diferencia em claro e escuro. Este parâmetro para os filmes proteicos variou entre 76,35 e 88,04 (Tabela 3.9), com a maioria deles acima de 80, indicando que são filmes mais claros.

Os resultados mostram que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados de opacidade mostraram que houve uma variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre 16,97% e 33,31%, indicando que são filmes opacos (Tabela 3.9). O tratamento 2 apresentou o filme menos opaco e o tratamento 10, o mais opaco. Esses resultados podem estar relacionados à desnaturação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares, nas quais as temperaturas de desnaturação são menores que a temperatura de tratamento térmico (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000). Além disso, a presença dos óleos essenciais de orégano e cravo-da-índia e do próprio isolado proteico contribuem para a coloração amarelada, o que provavelmente pode estar relacionado à opacidade encontrada neste estudo.

Os filmes mais opacos inibem a transmissão de luz, que pode ser uma característica desejada quando a luz é um fator de degradação para produtos embalados (ZAVAREZE et al., 2012). Foi relatado em outro trabalho a opacidade de filmes proteicos de tilápia com diferentes concentrações de plastificantes variando de 25% a 45% (SOBRAL et al., 2004). Esses valores são superiores aos encontrados neste estudo. No entanto, aproximam-se do encontrado para os filmes de corvina, que variaram de 10,9% a 14,2% (NOGUEIRA; MARTINS, 2018).

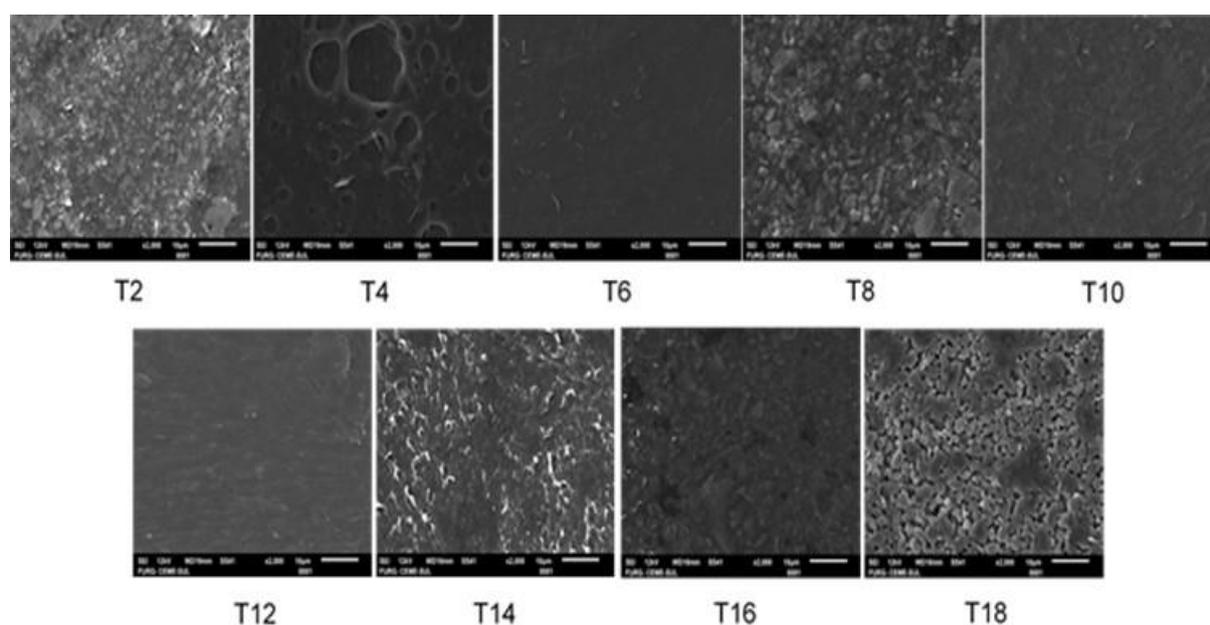
Segundo Brito (2013), a adição de óleos ou derivados promove um aumento na difração dos raios luminosos que atravessam o filme, produzindo assim maior opacidade. Os resultados

obtidos são superiores aos demonstrados por Fakhoury et al., (2012), que indicaram opacidade de 14,5 para filmes a base de amido de mandioca modificado, gelatina e glicerol.

### 3.3.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a relação entre características superficiais (homogeneidade, estrutura, porosidade, rachaduras e maciez) e propriedades (resistência à tração, alongamento e permeabilidade ao vapor de água) (BILBAO-SAINZ et al., 2010). Devido à grande profundidade do foco e à alta resolução, esta análise permite observar a estrutura dos filmes e os efeitos dos tratamentos no arranjo da matriz formadora de filme (CARVALHO et al., 2002).

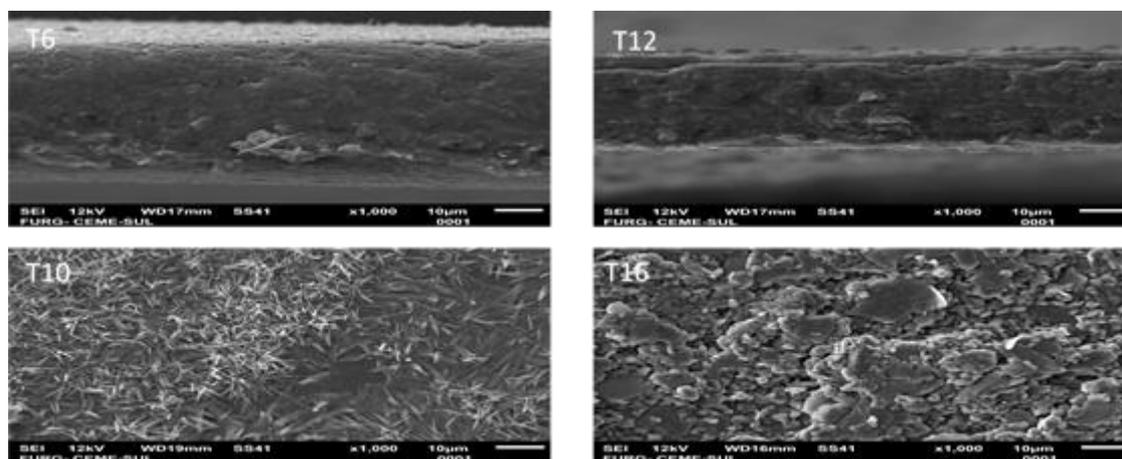
Os filmes apresentaram descontinuidades, presença de cristais aglomerados e/ou dispersos, bolhas que podem estar associadas ao processo de homogeneização na preparação do filme, secagem e interação molecular entre os compostos (Figura 3.9). As descontinuidades na estrutura do filme poderiam auxiliar na formação de vias preferenciais de difusão de vapor de água, o que explicaria a permeabilidade ao vapor de água (SOUZA et al., 2011; BODINI et al., 2013).



**Figura 3.9** Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície dos nove tratamentos de filme de isolado proteico de tilápia. Ampliação de 1000X.

Legenda: T2 (1,5g de IP, 0,2g de GLI e 0,1g de NA), T4 (1,5g de IP, 0,4g de GLI e 0,3g de NA), T6 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO e 0,3g de NA), T8 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO e 0,1g de NA), T10 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OC e 0,3g de NA), T12 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OC e 0,1g de NA), T14 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,1g de NA), T16 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,3g de NA) e T18 (1,0g de IP, 0,3g de GLI, 0,2g de OO, 0,2g de OC e 0,2g de NA).

De acordo com as fotomicrografias das bordas, os filmes isolados de proteína nos tratamentos 6 e 12 foram homogêneos, com estrutura compactada, livres de bolhas de ar, apesar de apresentarem irregularidades superficiais. As amostras apresentaram boa miscibilidade, sugerindo uma interação favorável entre os componentes dessas formulações (Figura 5). Essas interações e seu arranjo durante a formação do filme no processo de secagem alteram a estrutura final do mesmo (PASTOR et al., 2010), fato que pode ter influenciado as superfícies analisadas neste trabalho. Os filmes de proteína dos tratamentos 10 e 16 tinham uma superfície irregular, granular e porosa. Também foi possível observar que os glóbulos formados nas películas dos tratamentos 6 e 12 foram mais estabilizados dentro da estrutura proteica durante a secagem em comparação com os filmes dos tratamentos 10 e 16 (Figura 3.10).

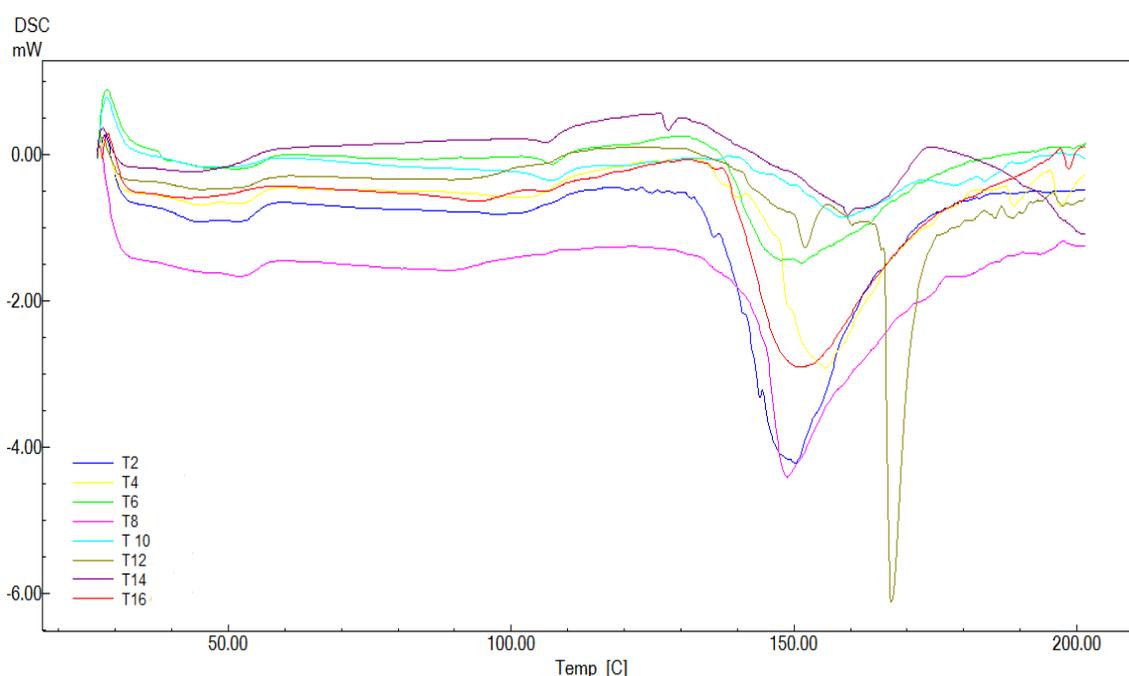


**Figura 3.10** Fotomicrografia eletrônica de varredura de filme de isolado proteico de tilápia, mostrando a lateral dos tratamentos T6 e T12 e a superfície do filme nos tratamentos T10 e T16. Ampliação de 2000X.

Legenda: T6 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO e 0,3g de NA), T10 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OC e 0,3g de NA), T12 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OC e 0,1g de NA) e T16 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,3g de NA).

### 3.3.4.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise DSC permitiu comparar os filmes dos tratamentos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 (Figura 6). Essa análise mede as temperaturas e o fluxo de calor associado às transições de material em função da temperatura e do tempo, fornecendo informações sobre mudanças físicas e químicas envolvendo processos endotérmicos, como transições de fase, desidratação, algumas decomposições e reações exotérmicas, incluindo cristalização, oxidação, reações de decomposição ou mudanças na capacidade de calor (SARPIETRO et al., 2014).



**Figura 3.11** Termogramas de DSC dos filmes de isolado proteico de tilápia.

Legenda: T2 (1,5g de IP, 0,2g de GLI e 0,1g de NA), T4 (1,5g de IP, 0,4g de GLI e 0,3g de NA), T6 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO e 0,3g de NA), T8 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO e 0,1g de NA), T10 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OC e 0,3g de NA), T12 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OC e 0,1g de nanoargila), T14 (1,5g de IP, 0,2g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,1g de NA), T16 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,3g de NA).

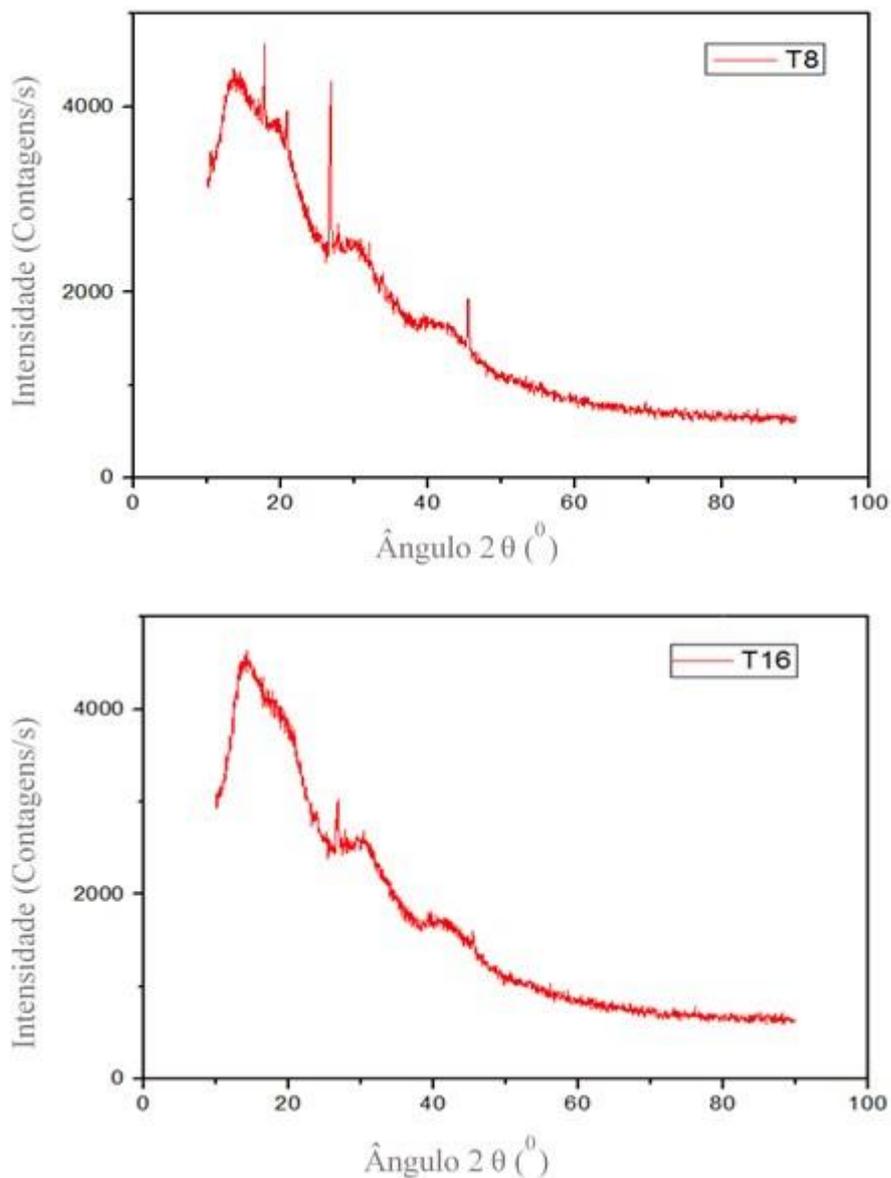
De acordo com a Figura 3.11, pode-se observar os picos endotérmicos com as seguintes características: temperatura de reação inicial próxima a 25 °C e picos entre 148 e 168 °C. A análise de DSC que apresentou o pico de temperatura mais elevado corresponde à fusão do tratamento 12. Representou a energia necessária capaz de elevar o estado de agitação molecular levando ao estado sólido ao estado líquido. Interações intercaladas entre o polímero e a

nanopartícula diminuem a mobilidade rotacional e translacional ao aumentar a temperatura, isto requer mais energia para ocorrer a transição vítrea. A temperatura de transição vítrea é tomada como o valor médio da faixa de temperatura que, durante o aquecimento de um polímero material, que está a uma temperatura muito baixa, muda para valores aumentados, permitindo que as cadeias poliméricas que estão em uma fase amorfa se tornem móveis, alterando a conformação da estrutura (ANDRADE et al., 2017).

#### **3.3.4.10 Análise de Difração de Raios-X**

As propriedades estruturais dos filmes proteicos da tilápia foram determinadas por análise de difração de raios X, onde as regiões cristalinas podem ser observadas através da presença de picos pontiagudos. A Figura 3.12 mostra o tipo de estrutura de filmes de isolado proteico de tilápia nos tratamentos 8 e 16, onde observa-se os espectros que abrangem o maior e o menor comprimento de onda.

Nenhuma mudança foi observada na formação das regiões cristalinas, mas na intensidade entre as amostras. O filme T8 mostrou-se mais cristalino que o filme T16. O filme T8 apresentou regiões cristalinas claramente observadas nos picos definidos nas regiões de  $2\theta = 17^\circ$ ,  $2\theta = 20^\circ$ ,  $2\theta = 25^\circ$  e  $2\theta = 45^\circ$ , enquanto no filme T16 predomina uma estrutura semelhante a polímero com picos nas regiões  $2\theta = 25^\circ$  e  $2\theta = 45^\circ$ , mostrando bandas largas na região entre  $2\theta = 15^\circ$  e  $2\theta = 42^\circ$ . As bandas largas observadas nessa região indicam que os filmes T16 apresentaram uma porcentagem muito baixa do grau de cristalinidade quando comparados aos filmes T8 (Figura 3.12). A presença de picos nos filmes proteicos da tilápia deve-se ao fato de que quando a irradiação afeta a camada superficial do filme com os demais componentes, um reflexo da irradiação deixa de penetrar, representando um filme amorfo, possivelmente devido à sua composição.



**Figura 3.12** Difratoograma de filmes de isolado proteico de tilápia.

Legenda: T8 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO e 0,1g de NA) e T16 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,3g de NA).

Bidusk et al. (2017) em seus estudos com filmes de biocompostos de amido de trigo fosforilados e reticulados na presença de oxido de polietileno, verificaram que os filmes apresentaram uma estrutura semicristalina, com uma maior região amorfa, característica de materiais de amido submetidos ao processamento térmico.

#### 3.3.4.10 Espectroscopia Infravermelha (FTIR)

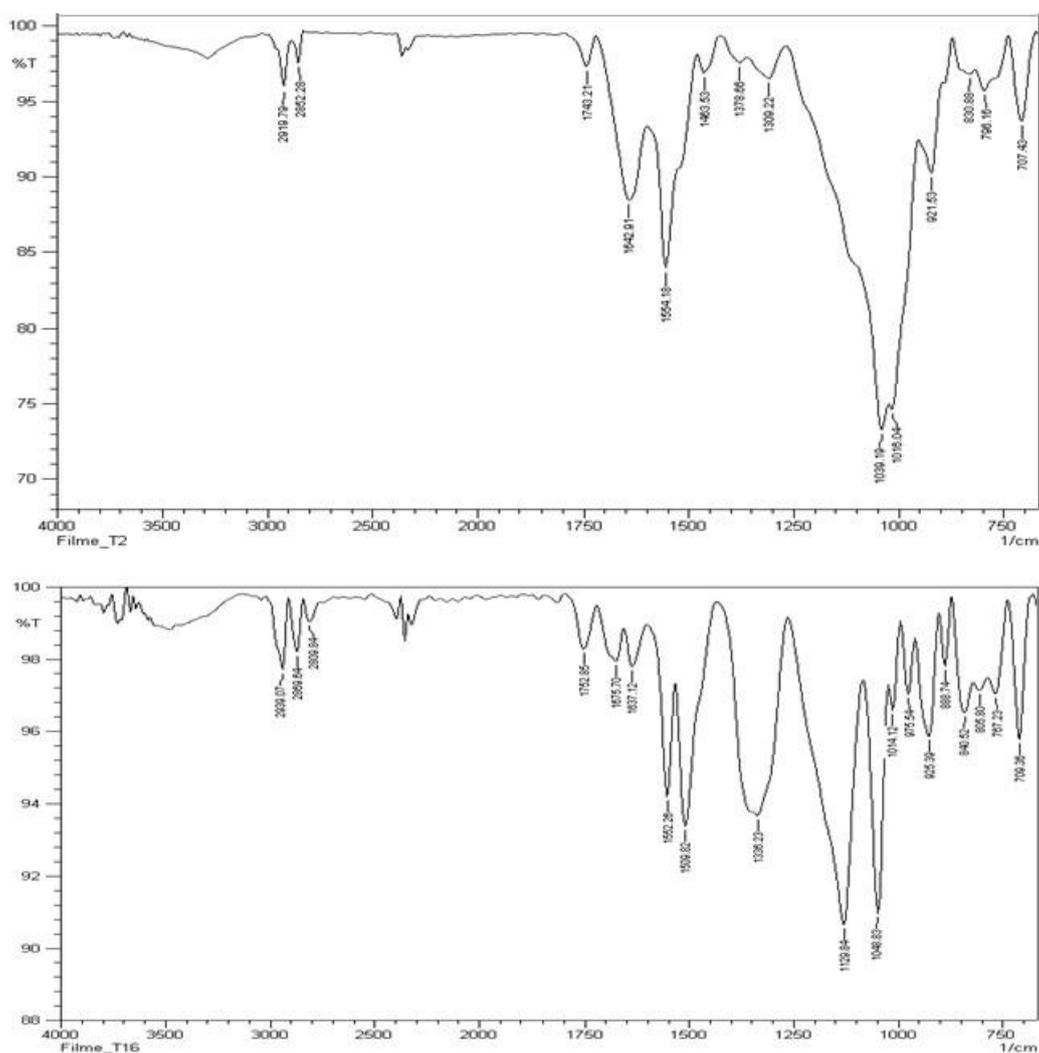
Os espectros de absorção dos filmes de proteína de tilápia de T2 e T16 são observados na faixa de  $4000 - 750 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 3.13). Estes tratamentos representam os espectros com a menor e a maior intensidade dos picos característicos dos grupos funcionais.

Nesta região, as variações na estrutura da amostra são diferenciadas pela localização do pico de absorção na banda do comprimento de onda característico e pela intensidade da absorção de energia.

A comparação dos espectros obtidos a partir dos filmes T2 (menor concentração dos componentes) e dos filmes T16 (maior concentração dos componentes) revelou diversas variações devido às interações intermoleculares e intramoleculares (Figura 3.13).

Os espectros de infravermelho dos filmes proteicos de tilápia mostraram que eles têm uma estrutura amorfa como consequência do tratamento térmico feito na solução filmogênica e que as propriedades dos filmes estão associadas às bandas de absorbância entre  $1752$  e  $709 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros mostram um aumento na largura de banda de  $50 \text{ cm}^{-1}$ , sendo possível verificar os picos em diferentes comprimentos de onda em ambos os filmes (Figura 8). Certas bandas de absorção, como aquelas dos modos de deformação axial de C-H, O-H e C=O, permanecem predominantemente estáveis no espectro, independentemente das interações.

As principais características estruturais observadas dos filmes proteicos e as interações entre seus componentes indicam que houve interação entre o isolado proteico, o glicerol, os óleos essenciais e a nanoargila. As amplitudes de pico do filme T16 foram maiores, possivelmente devido às maiores concentrações das variáveis avaliadas.



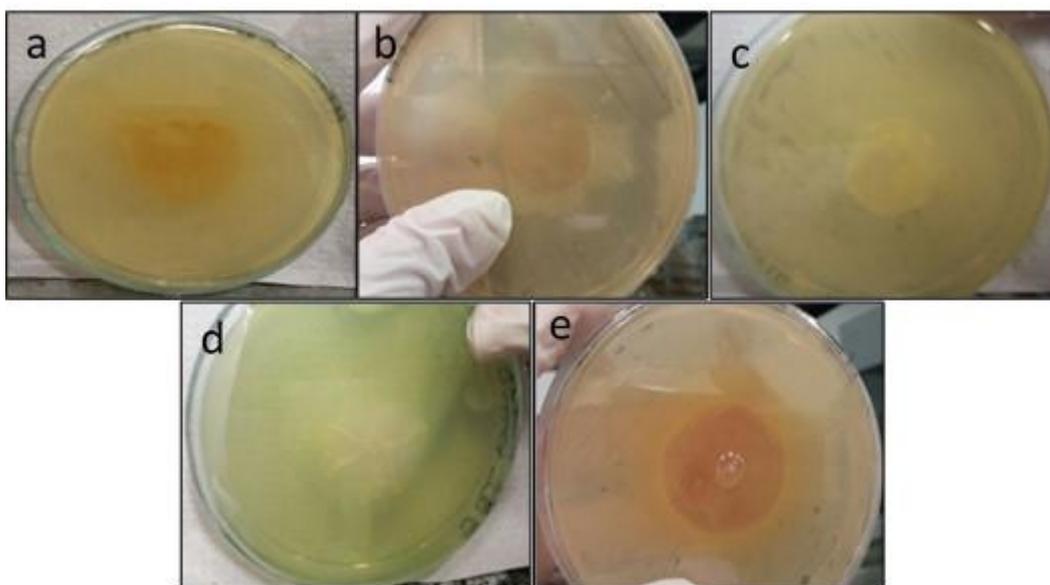
**Figura 3.13** Espectro de filme de isolado proteico de tilápia T2 e T16, na faixa de número de onda de 4000 – 750  $\text{cm}^{-1}$ .

Legenda: T2 (1,5g de IP, 0,2g de GLI e 0,1g de NA), e T16 (1,5g de IP, 0,4g de GLI, 0,4g de OO, 0,4g de OC e 0,3g de NA).

### 3.3.4.11 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* nos filmes proteicos foi realizada pelo método de difusão em disco, incorporando diferentes concentrações de glicerol, nanoargila e óleos essenciais (Figura 3.14).

Os resultados obtidos demonstraram que os discos de filme não eram adequados para a formação de halo inibitório (Figura 3.14), isto é, os óleos essenciais não apresentavam a atividade antimicrobiana esperada. Sabe-se que fatores como condições de cultivo, meio de cultura, concentração de substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados podem interferir nos resultados antimicrobianos (RÍOS; RECIO, 2005) e que o uso de antimicrobianos e a técnica utilizada para a formação de filmes pode modificar as propriedades físicas, mecânicas e antimicrobianas dos filmes de proteínas, devido à sua interação com os vários agentes microbianos (SAYANJALI et al., 2011). Como não houve nenhum problema identificado durante a preparação das culturas, é mais provável que a perda da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tenha ocorrido devido a mudanças em sua própria estrutura durante a formação da estrutura da matriz polimérica dos filmes.



**Figura 3.14** Atividade antimicrobiana dos filmes biopoliméricos de isolado proteico de tilápia. Legenda: A avaliação da atividade antimicrobiana para: a = *Staphylococcus aureus*; b = *Staphylococcus epidermidis*; c = *Escherichia coli*; d = *Pseudomonas aeruginosa*; e = *Salmonella typhimurium*.

### 3.4 CONCLUSÃO

A técnica utilizada para extrair as proteínas miofibrilares foi eficaz para produzir um isolado proteico de alto valor agregado a partir de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). O isolado proteico obtido apresentou 85% de proteína total da matéria-prima, permitindo sua utilização como alternativa para a produção de filmes de biopolímeros à base de proteínas.

Neste trabalho os óleos essenciais de glicerol, nanoargila e cravo-da-índia e orégano foram incorporados com sucesso aos filmes. Apesar da adição de isolado proteico ter apresentado maior influência na solubilidade do parâmetro na água do que os demais componentes, essa influência foi negativa. Assim, a redução do isolado proteico aumentou a solubilidade dos filmes. Essa característica também foi observada para os parâmetros permeabilidade ao vapor de água e alongação, onde as variáveis proteína isolada e nanoargila, respectivamente, influenciaram mais negativamente as características dos filmes analisados. Para a solubilidade ácida e resistência à tração, a influência foi positiva, sendo o glicerol e o isolado proteico, respectivamente, os fatores mais significativos. Assim, quanto maior a concentração desses componentes, maior a solubilidade ácida e a resistência à tração.

Os óleos essenciais não apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* quando incorporados aos demais componentes dos filmes.

### 3.5 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A.; BORNEO, R.; LEÓN, A. E. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2-9, 2013.

ANDRADE, C. S.; FONSECA, G. G.; MEI, L. H. I.; FAKHOURI, F. M. Development and characterization of multilayer films based on polyhydroxyalkanoates and hydrocolloids. *Journal of Applied Polymer Science*. 016, 133, 44458, 2017.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 18th ed, 2000.

ARDAKANI, K. M.; NAVARCHIAN, A. H.; SADEGUI, F. Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 79, 547-554, 2010.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard methods of water vapor transmission of materials. Método: E00996-00. In: ASTM annual book of ASTM standards, p. 907-914, 2000a.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting. Método: D00882-00. In: ASTM annual book of ASTM standards, p.160-168, 2000b.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: **Editora da Unicamp**, 299p. 1996.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: **Editora da Unicamp**. 2002.

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

BIDUSK, B.; EVANGELIO, J. A.; SILVA, F. T.; HALAL, S. L. M.; TAKIMI, A. S.; CARRENO, N. L. V.; DIAS, A. R. G.; ZAVARESE, E. R. Physicochemical properties of nanocomposite films made from sorghum-oxidized starch and nanoclay. **Starch Journal**, 69, 1700079, 2017.

BILBAO-SAINZ, C.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MADEIRA, D. F.; WILLIAMS, T. G.; MCHUGH, T. H. Nanoemulsões preparadas por um método de emulsificação de baixa energia aplicada a filmes comestíveis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(22), 11932-11938, 2010.

BODINI, R. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CARVALHO, R. A. Properties of gelatin-based films with added ethanolepropolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, 51, 104-110, 2013.

BRASILEIRO, O. L.; CAVALHEIRO, J. M. O.; PRADO, J. P. S.; ANJOS, A. G.; CAVALHEIRO, T. T. B. Determination of the chemical composition and functional properties of shrimp waste protein concentrate and lyophilized flour. **Ciência e Agrotecnologia**, 36, 189-194, 2012.

BRITO, R. M. Elaboração e caracterização de filmes a base de amido, gelatina, glicerol e óleo essencial. 39p. Monografia (Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina. 2013.

CARVALHO, A. C. F. B.; LIMA, V. H. C.; PEREIRA, G. T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Revista Higiene**, 16, 89-94, 2002.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. "Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties", **Food Chemistry**, 120(3), 652-657, 2010.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, 78(11), 2563-2583, 1995.

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

CHUAYNUKUL, K.; PRODPRAN, T.; BENJAKUL, S. Properties of thermo-compression molded bovine and fish gelatin films as influenced by resin preparation condition. **International Food Research Journal**, 22(3), 1095-1102, 2015.

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

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Methylcellulose-Based Edible Films and Coatings: Mechanical and Thermal Properties as a Function of Plasticizer Content. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 45, 685-689, 1997.

DI PIERRO, P.; CHICO, B.; VILLALONGA, R.; MARINIELLO, L.; DAMAIO, A. E.; MASI, P.; PORTA, R. Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties. **Biomacromolecules**, 7(3), 744-749, 2006.

FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M.; BERTAN, L. C.; YAMASHITA, F.; INNOCENTINI MEI, L. H.; COLLARES QUEIROZ, F. P. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin - Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. **LWT – Food Science and Technology**, 49, 149-154, 2012.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Effect of fatty acid addition on the properties of biopolymer films based on lipophilic maize starch and gelatin. **Starke**, 61, 528-536, 2009.

FLORES, J.; BERMELL, S. Propriedades funcionales de las proteínas miofibrilares: capacidad de retención de água. **Rev Agroq Tec Aliment**, 24, 151-8. 1984.

FONKWE, L. G., SINGH, R. K. **Process Biochemistry** 32, 309, 1996.

FONTANA, A.; CENTENARO, G. S.; PALEZI, S. C.; PRENTICE-HERNANDEZ, C. Obtainment and evaluation of protein concentrates of whitemouth croaker (*micropogonias furnieri*) processed by chemical extraction. **Química Nova**, 32, 2299-2303, 2009.

GALIETTA, G.; DI GIOLA, L.; GUIBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, 81(12), 3123-3130, 1998.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In: Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. (eds). Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA, 1994.

GHASEMLOU, M.; KHODAIYAN, F.; OROMIEHIE, A. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. **Food Chem.**, 127, 1496-1502, 2011.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, 57, 190-199, 1992.

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

HUNTERLAB. The color management company. Universal software, version 3.2. Reston, 1997.

KELLEHER, S. D.; HULTIN, H. O. Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source and Protein Composition, Advanced Protein Technologies Inc., Rockport, 1999.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual do Biodiesel. Edgard Blücher: São Paulo. 2006.

KUNTE, L. A.; GENNADIOS, A.; CUPPETT, S. L.; HANNA, M. A.; WELLER, C. L. Cast films from soy protein isolates and fractions. **Cereal Chemistry**, 74, 115-118, 1997.

MALI, S.; SAKANAKA, L. S.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, 60, 283-289, 2005.

MATTA JUNIOR, M. D.; SARMENTO, S. B. S.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ZOCCHI, S. S. Barrier properties of films of pea starch associated with xanthan gum and glycerol. **Polímeros**, 21(1), 67-72, 2011.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs glycerol – plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42(4), 841-845, 1994.

MONICA, B.; IOAN, S. Essential oils from plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, 1, 35-43, 2019.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Extraction and properties of Nile tilapia myofibrillar proteins for edible films. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(1), 179-189, 2000.

NCCL - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: proposed guideline M44-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2003.

NAKASHIMA, A. Y.; CHEVALIER, R. C.; CORTEZ-VEGA, W. R. Development and characterization of collagen films with added essential oil of clove *índia*. **Journal of Bioenergy and Food Science**, 03(1), 50-57, 2016.

NOGUEIRA, D.; MARTINS, V. G. Biodegradable bilayer films prepared from individual films of different proteins. **Journal of Applied Polymer Science**, 135, 1-13, 2018.

OLIVEIRA, M. C.; CRUZ, G. R. B.; ALMEIDA, N. M. Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Pulp-of-Tilapia-Based (*Oreochromis niloticus*) Meatballs. **Ciências Biológicas e da Saúde**, 14(1), 37-44, 2012.

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**, 82, 1174-1183, 2010.

PEREZ-GAGO, M. P.; KROCHTA, J. M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 51, 60-74, 2000.

PIMENTEL, T.; PIZZUTI, L.; FAKHOURI, F. M.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; FONSECA, G. G. Development of multilayer films obtained from epoxidized methyl esters, polyhydroxyalkanoates and their combinations. **Journal of Polymers and the Environment**, 26, 1661-1672, 2018.

REBOUÇAS, M. C.; RODRIGUES, M. C. P.; CASTRO, R. J. S; VIEIRA, J. M. M. Characterization of fish protein concentrate obtained from the Nile tilapia flleting residues. **Semina: Ciências Agrárias**, 33(2), 697-704, 2012.

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

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol**, 100, 80-84, 2005.

ROCHA, M.; 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. *J. of Food Eng.*, v.116, p.666-673, 2014.

SARPIETRO, M. G.; ACCOLLA, M. L.; SANTORO, N.; MANSFELD, F. M.; PIGNATELLO, R.; TOTH, I.; CASTELLI, F. Calorimetry and Langmuir-Blodgett studies on

the interaction of a lipophilic prodrug of LHRH with biomembrane models. **Journal of Colloid and Interface Science**, 421, 122-131, 2014.

SATHIVEL, S.; BECHTEL, P. Properties of soluble protein powders from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*). **International Journal of Food Science and Technology**, 41(5), 520-529, 2006.

SAYANJALI, S.; GHANBARZADEH, B.; GHIASSIFAR, S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 1133-1138, 2011.

SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A.; ARMADA, M. Water barrier properties of starch-clay nanocomposite films. **Brazilian Journal of Food Technology**, 15(3), 208-218, 2012.

SOBRAL, P. J. A. Thickness effects of myofibrillar protein based edible films on their functional properties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35, 1251-1259, 2000.

SOBRAL, P. J. A.; GARCIA, F. T.; HABITANTE, A. M. Q. B.; MONTERREY-QUINTERO, E. S. Properties of edible films based on different concentrations of plasticizer and Nile Tilapia muscle protein. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 93(3), 2004.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; TORTORA, M.; VITTORIA, V. Barrier properties of polymer/clay nanocomposites. In Mai, Y. W. e Yu, Z. Z. (Eds.), **Polymer Nanocomposites**, 273-292, 2006.

SOUZA, V. C.; MONTE, M. L.; PINTO, L. A. A. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. **International Journal of Food Science & Technology**, 46(9), 1856-1862, 2011.

TANADA-PALMU, P. S.; HÉLEN, H.; HYVÖNEN, L. Preparation, properties and applications of wheat gluten edible films. **Journal of Agricultural Food Science**, 9, 23-35, 2000.

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

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

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

YANAR, Y.; CELIK, M.; AKAMCA, E. Effects of brine concentration on shelf-life of hot-smoked tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored at 4°C. **Food Chemistry**, 97(2), 244-247, 2006.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L. M.; TELLES, CAMPELLO, A.; PRENTICE, C. H. Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Brazilian Journal of Food Technology**, 15, 53-57, 2012.

#### 4 ELABORAÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COM INCORPORAÇÃO DE GELATINA

**Resumo:** Estudos que visem novos materiais e tecnologias capazes de reduzir danos ambientais tem aumentado nos últimos anos. Pesquisas em todo o mundo vem crescendo com interesse de reduzir a utilização de materiais de difícil degradação e busca-se por alternativas viáveis para substituição destes materiais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver filmes à base de isolado proteico de tilápia com diferentes concentrações de gelatina, glicerol e sorbitol; avaliar as propriedades de espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água (PVA), resistência à tração, alongação, cor e opacidade. Para obtenção dos filmes utilizou-se a técnica de *casting* empregando diferentes combinações de isolado proteico (0,0; 0,75; 1,5; 2,25 e 3,0 g/100 mL de água), gelatina (0,0; 0,75; 1,5; 2,25 e 3,0 g/100 mL de água) e plastificantes glicerol ou sorbitol (0,0; 0,15; 0,3; 0,45 e 0,6 g/100 mL de água). Os filmes apresentaram boa continuidade, manuseabilidade e ausência de bolhas e rachaduras na superfície. Os filmes proteicos com gelatina apresentaram valores para espessura com variação entre 0,04 a 0,09 mm, para solubilidade em água os resultados variaram entre 4,11 e 28,72%. Os valores obtidos para PVA encontram-se entre 7,12 e 16,36  $\text{gmm d}^{-1}\text{KPa}^{-1}\text{m}^{-2}$ , resistência à tração de 12,43 a 155,57 MPa e para alongação de 2,14 a 125,33%. Os filmes proteicos com gelatina apresentaram-se promissores, do ponto de vista das propriedades mecânicas, aparência visual e fácil manuseio, bem como baixa permeabilidade ao vapor de água e a baixa solubilidade. Concluiu-se que o isolado proteico foi a variável que apresentou maior influencia sobre os parâmetros espessura, solubilidade, PVA e alongação. Apresentaram bons aspectos homogêneos, contínuos, boa manuseabilidade e apresentaram coloração tendendo para o amarelo.

**Palavras-chave:** gelatina; biopolímeros; concentração

**Abstract:** Studies targeting new materials and technologies that can reduce environmental damage have increased in recent years. Research around the world has been growing with a view to reducing the use of materials that are difficult to degrade and looking for viable alternatives to replace these materials. Thus, the objective of this work was to develop tilapia protein isolate films with different concentrations of gelatin, glycerol and sorbitol; evaluate the properties of thickness, water solubility, water vapor permeability (WVP), tensile strength, elongation, color and opacity. The films were obtained by casting using different combinations of protein isolate (0.0, 0.75, 1.5, 2.25 and 3.0 g / 100 mL of water), gelatin (0.0 0.75, 1.5, 2.25 and 3.0 g / 100 mL water) and plasticizers glycerol or sorbitol (0.0; 0.15; 0.3; 0.45 and 0.6 g / 100 mL of water). The films presented good continuity, maneuverability and absence of bubbles and cracks on the surface. The gelatin protein films presented values for thickness ranging from 0.04 to 0.09 mm, for water solubility the results ranged from 4.11 to 28.72%. The values obtained for PVA are between 7.12 and 16.36  $\text{gmm d}^{-1}\text{KPa}^{-1}\text{m}^{-2}$ , tensile strength from 12.43 to 155.57 MPa and for elongation from 2.14 to 125.33%. Gelatine protein films were promising from the point of view of mechanical properties, visual appearance and easy handling, as well as low water vapor permeability and low solubility. It was concluded that the protein isolate was the variable that had the greatest influence on the parameters thickness, solubility, PVA and elongation. They presented good homogeneous, continuous aspects, good maneuverability and presented a color tending towards yellow.

**Keywords:** gelatine; biopolymers; concentration

## 4.1 INTRODUÇÃO

Novos materiais e tecnologias capazes de minimizar danos ao meio ambiente tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Pesquisas que visam a redução na utilização de materiais de difícil degradação vem crescendo em todo o mundo, buscando-se por alternativas viáveis para substituição destes materiais (FARIAS et al., 2012).

Neste contexto, os filmes biodegradáveis formados a partir de polímeros naturais, especialmente proteínas, polissacarídeos e lipídios estão inseridos por apresentarem potencial aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 2000; DIÉGUEZ et al., 2015).

De maneira geral, os filmes à base de proteína apresentam boa resistência mecânica, porém reduzida barreira ao vapor de água (GÓMEZ-ESTACA et al., 2016). Por outro lado, devido às características hidrofílicas da proteína, possuem limitações relacionadas a sua pouca estabilidade frente às mudanças climáticas e à alta solubilidade em água, esses filmes apresentam elevada susceptibilidade às condições ambientais o que dificulta sua aplicação como embalagem. Na tentativa de melhorar estas características, diversas alternativas têm sido estudadas, tais como: modificação química e enzimática da gelatina (CARVALHO; GROSSO, 2006); utilização de misturas de plastificantes (THOMAZINE et al., 2005); incorporação de lipídios (BERTAN et al., 2005) e avaliação do efeito de diferentes plastificantes com diferentes graus de hidrofobicidade (VANIN et al., 2005).

Nos últimos anos as proteínas de pescado tem sido estudadas com interesse na tecnologia de biofilmes. Os filmes biodegradáveis à base de pescado exibem alguns atributos interessantes como a capacidade de formar redes, plasticidade e elasticidade (ZAVAREZE et al., 2012).

Dentre as proteínas, a gelatina desperta interesse por ser uma matéria-prima abundante, produzida praticamente em todo o mundo com custo relativamente baixo e por ter excelentes propriedades funcionais e filmogênica (CARVALHO et al., 2002; SARANTOPÓULOS et al., 2002). Este fato esta associado principalmente à estrutura específica que as proteínas possuem e a sua capacidade de formar ligações covalentes intermoleculares e ligações de hidrogênio (SOUSA, 2012).

Os plastificantes são aderidos na matriz dos filmes, o que gera aumento no espaço livre entre as cadeias poliméricas, provocando a diminuição das forças intermoleculares, aumento da flexibilidade e manuseabilidade, com redução de possíveis descontinuidades e regiões

quebradiças devido a facilidade dessas moléculas de se ligarem entre as cadeias dos polissacarídeos por quebra das pontes de hidrogênio (ANDRECEUTTI et al., 2010). Os plastificantes devem ser compatíveis com o biopolímeros, o glicerol e o sorbitol possuem propriedades que interagem com as cadeias do filme, aumentando a mobilidade molecular e a flexibilidade, embora possam aumentar a hidrofobicidade e permeabilidade ao vapor de água dos mesmos (ALVES et al., 2015).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da adição de diferentes concentrações de glicerol, sorbitol e gelatina em filmes proteicos oriundos de resíduos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a fim de avaliar o efeito destes componentes nas propriedades filmogênicas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção dos filmes biopoliméricos

Os filmes de isolado proteico e gelatina foram elaborados segundo a técnica *casting*. A solução filmogênica foi elaborada com 100 mL de água destilada com as seguintes concentrações de isolado proteico de tilápia (0,0; 0,75; 1,5; 2,25 e 3,0 %); gelatina (0,0; 0,75; 1,5; 2,25 e 3,0 %) e glicerol ou sorbitol (0,0; 0,15; 0,3; 0,45 e 0,6 %).

Inicialmente para o preparo da dispersão aquosa, o isolado proteico de tilápia foi acrescido de 100 mL de água destilada em béquer. Esta dispersão aquosa foi mantida em agitação suave e constante por 10 min. em agitador magnético (TECNAL, modelo TE - 0851, São Paulo, Brasil) a 30 °C, para hidratação do isolado. Após à hidratação, ajustou-se o pH da dispersão para 11 com adição de NaOH 1 N (Merck) utilizando pHmetro de bancada (modelo QUIMIS, São Paulo, Brasil) mantendo-se agitação constante por mais 10 min. Em seguida, a temperatura foi elevada para 80 °C. Após a completa dissolução do isolado proteico, adicionou-se o glicerol ou sorbitol previamente solubilizado em água destilada, mantendo-se o pH em 11. Posteriormente, a solução filmogênica foi mantida em agitação por 20 min. e reservada para ser acrescida da segunda solução filmogênica.

Para obtenção da solução filmogênica, a concentração de gelatina (g) foi pesada em balança analítica (CE, modelo AY220, Filipinas). Após homogeneização, a solução foi levada ao banho termostático (TECNAL, modelo TE-054 MAG, São Paulo, Brasil) sem agitação, aquecido a 80 °C, por 10 min. A solução foi mantida sob agitação reduzida para evitar a

formação de precipitados e melhor homogeneização da amostra. Após a obtenção da solução filmogênica de gelatina, foi adicionada a solução filmogênica preparada anteriormente de maneira suave para evitar a formação de bolhas na amostra. Para produção dos filmes, a solução filmogênica (30 mL) foi transferida para placa de Petri. Os filmes foram feitos em triplicatas, com secagem em temperatura ambiente controlada a 25°C, durante 96 h e armazenados em umidade relativa de 56%, para posteriores análises.

#### **4.2.2 Avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos**

Para a avaliação subjetiva dos filmes biopoliméricos, foram empregados parâmetros estabelecidos por Gontard et al., (1992), verificando-se as seguintes características dos filmes: continuidade (ausência de ruptura ou fratura após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou bolhas visíveis ao olho nu, ou zonas de opacidade ou de cores diferenciadas) e manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura). Os filmes que não apresentaram tais características foram descartados.

#### **4.2.3 Caracterização de filmes biopoliméricos**

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

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

##### **4.2.3.1 Espessura**

A espessura do filme foi medida usando um micrômetro externo (Digimes, São Paulo, Brasil). O valor final representou a média de 5 medições aleatórias feitas em diferentes partes do filme.

#### 4.2.3.2 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi determinada de acordo com o método proposto por GONTARD et al., (1994). Amostras de discos com 2 cm de diâmetro foram extraídas dos filmes em triplicata. A matéria seca inicial das amostras foi obtida por secagem em estufa de circulação de ar forçado por 24 h a 105 °C. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em recipiente contendo 50 mL de água destilada e mantidas sob agitação lenta constante a 50 rpm em agitador orbital a 25 °C por 24 h (Cientec, CT-712RNT). As amostras foram então removidas e secas em estufa de circulação de ar forçado e de renovação a 105 °C durante mais 24 h antes de determinar a matéria seca final. A solubilidade do filme foi representada pelo material solúvel total dissolvido em água, calculado de acordo com a Eq. 4.1.

$$S(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde: S = solubilidade em água (%);  $m_i$  = massa seca inicial da amostra (g);  $m_f$  = massa seca final da amostra (g).

#### 4.2.3.3 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada em triplicata de acordo com o método gravimétrico padrão modificado E-96 (ASTM, 2000a). Os filmes foram selados em células de alumínio de permeação com área de permeação de 0,13 m<sup>2</sup>, contendo cloreto de cálcio e selados com parafina para garantir a migração da umidade somente através da área exposta do bioplástico. As células de permeação foram colocadas em dessecadores mantidos a 25 °C e umidade relativa de 75%. A quantidade de vapor de água que migra através do filme foi determinada a partir do ganho de massa do cloreto de cálcio, medido a cada 24 h por 7 dias (PIMENTEL et al., 2018). O efeito do espaço aéreo entre a região abaixo do filme e a superfície do cloreto de cálcio das células de teste não foi considerado no cálculo (GENNADIOS et al., 1994; MCHUGH; KROCHTA, 1994). A PVA foi calculada de acordo com a Eq. 4.2.

$$PVA = \frac{\Delta W}{t \times AE} \times \frac{L}{\Delta P} \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde: PVA = permeabilidade ao vapor de água  $\text{g mm dia}^{-1} \text{kPa}^{-1} \text{m}^{-2}$ ;  $\Delta W$  = ganho de massa pela célula (g); L = espessura inicial do filme (mm); t = tempo de armazenamento (dias); AE = área do filme exposta ( $\text{m}^2$ );  $\Delta P$  = diferença de pressão parcial (kPa).

#### 4.2.3.4 Resistência à tração e alongação

A resistência à tração e a alongação na ruptura foram determinados em triplicata usando o Analisador de Textura TA-XT2 (SMS, Surrey, UK), operado de acordo com o método padrão ASTM D 882-83 (ASTM, 2000b), modificado em outros trabalhos (TANADA-PALMU et al., 2000). Os filmes foram cortados em retângulos (8,0 cm de comprimento por 2,5 cm de largura) e fixados em garras com distância inicial até a separação de 5,0 cm. A velocidade dos testes foi fixada em 0,8 mm/s. A resistência à tração foi calculada dividindo a força máxima para a ruptura do filme pela área da seção transversal do filme (Eq. 4.3). A alongação na ruptura foi determinada dividindo-se a diferença entre a distância final percorrida até a ruptura e a distância inicial de separação pela distância inicial de separação multiplicada por 100 (Eq.4.4).

$$RT = \frac{F_m}{A} \quad \text{Equação 4.3}$$

Onde: RT = resistência à tração (MPa);  $F_m$  = força máxima no momento da ruptura (N); A = área da secção transversal do filme ( $\text{m}^2$ ).

$$E = \frac{(d_r - d_o)}{d_o} \times 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde: E = alongação (%);  $d_o$  = separação inicial entre as garras (cm);  $d_r$  = separação entre as garras no momento da ruptura (cm).

#### 4.2.3.5 Cor

A cor dos filmes foi determinada pela média de três medições, uma no centro e as outras duas no perímetro (distância da borda) usando um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Chroma Meter, Japão), operando a D65 (luz do dia).

Os parâmetros chroma  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$  (luminosidade) foram determinados em triplicata, sobrepondo o isolado proteico ao padrão branco.  $L^*$  indica a luminosidade e  $a^*$  e  $b^*$  as coordenadas cromatográficas. As escalas CIE-Lab foram usadas para medir a cor dos filmes,

com  $L^*$  variando de 0 (preto) a 100 (branco),  $a^*$  de verde (-60) a vermelho (+60) e  $b^*$  de azul (-60) para amarelo (+60) (KUNTE et al., 1997). A diferença de cor em relação ao padrão foi determinada usando a Eq. 4.5 (HUNTERLAB, 1997):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação 4.5}$$

#### 4.2.3.6 Opacidade

A opacidade (Y) foi determinada usando um colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Chroma Meter, Japão), conforme SOBRAL, (2000). As medidas foram feitas em triplicata após a calibração do colorímetro com fundo branco ( $Y_w$ ) e preto ( $Y_b$ ). Os valores de opacidade foram calculados de acordo com a Eq. 4.6 (HUNTERLAB, 1997):

$$Y = \frac{Y_p}{Y_b} \quad \text{Equação 4.6}$$

Onde: Y = opacidade do filme (%);  $Y_p$  = opacidade do filme em fundo preto;  $Y_b$  = opacidade do filme em fundo branco.

#### 4.2.3.7 Análise estatística

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

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Obtenção e avaliação subjetiva dos filmes

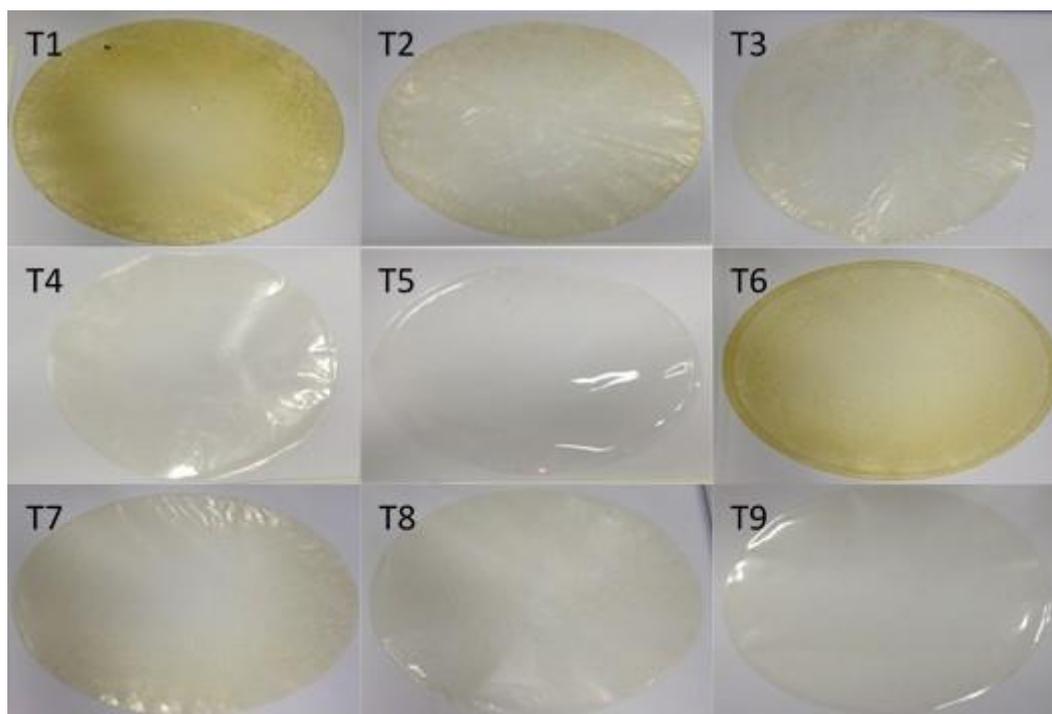
A avaliação subjetiva (GONTARD et al., 1992) foi utilizada para analisar as características visuais dos filmes de isolado proteico e gelatina, conforme descrito na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** Avaliação subjetiva dos filmes de isolado proteico de tilápia.

Tratamentos	Variáveis independentes*				Características**		
	IP	GEL	GLI	SOR	C	H	M
1	3,0	0,0	0,6	0,0	xxx	xx	xxx
2	2,25	0,75	0,45	0,0	xxx	xx	xxx
3	1,5	1,5	0,3	0,0	xxx	xx	xxx
4	0,75	2,25	0,15	0,0	xxx	xxx	xxx
5	0,0	3,0	0,0	0,0	xxx	xxx	xxx
6	3,0	0,0	0,0	0,6	xxx	xx	xxx
7	2,25	0,75	0,0	0,45	xxx	xx	xxx
8	1,5	1,5	0,0	0,3	xxx	xx	xxx
9	0,75	2,25	0,0	0,15	xxx	xxx	xxx

Onde: \* IP = isolado proteico de tilápia, GEL = gelatina, GLI = glicerol, SOR = sorbitol  
 \*\*C = continuidade, H = homogeneidade, M = manuseabilidade, xxx excelente, xx bom, x deficiente.

A avaliação subjetiva (Tabela 4.1) mostra que os filmes proteicos com gelatina apresentaram excelente continuidade e manuseabilidade, não houve dificuldades em retirar os filmes das placas, mantendo a integridade dos mesmos, estas características são de extrema importância para a realização da caracterização dos filmes. Para o aspecto homogeneidade, os filmes exibiram-se contínuos, sem rachaduras ou rupturas após o processo de secagem, no entanto, os tratamentos T1, T2, T3, T6, T7 e T8, apresentaram partículas insolúveis visíveis a olho nu, fato este, demonstra que não houve completa solubilização do isolado proteico e que o mesmo é o responsável pela acentuada coloração amarelada observada nos tratamentos T1 e T6 que possuem a maior concentração deste componente. Contudo todos os tratamentos avaliados obtiveram resultados satisfatórios para os parâmetros analisados, conforme observado na Figura 4.1.



**Figura 4.1** Produção de filme com as diferentes concentrações de isolado proteico e gelatina.

Legenda: T1 (3,0g de IP, 0,6g de GLI), T2 (2,25g de IP, 0,75g de GEL e 0,45g de GLI), T3 (1,5g de IP, 1,5g de GEL e 0,3g de GLI), T4 (0,75g de IP, 2,25g de GEL e 0,15g de GLI), T5 (3,0g de GEL), T6 (3,0g de IP, 0,6g de SOR), T7 (2,25g de IP, 0,75g de GEL e 0,45g de SOR), T8 (1,5g de IP, 1,5g de GEL e 0,3g de SOR) e T9 (0,75g de IP, 2,25g de GEL e 0,15g de SOR).

Para estabelecer uma solução filmogênica flexível e hidrofóbica, é necessária a utilização de plastificantes que são responsáveis por estas características, no entanto, em concentrações baixas, podem causar um efeito antiplastificante (SUPPAKUL et al., 2013) e, em concentrações altas, efeito hidrofílico em filmes produzidos pela técnica de *casting*, ou seja, podem causar efeito contrário ao desejado.

#### 4.3.2 Caracterização dos filmes biopoliméricos

Os resultados obtidos como respostas para os parâmetros espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongação, estão apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** Valores obtidos pelos filmes de isolado proteico de tilápia, correspondente às concentrações de cada experimento.

Ensaio	ES* (mm)	S* (%)	PVA* (g mm dia <sup>-1</sup> kPa <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	RT* (MPa)	E* (%)
T1	0,09 ± 0,009 <sup>a</sup>	28,72 ± 2,39 <sup>a</sup>	16,36 ± 2,29 <sup>a</sup>	18,87 ± 1,65 <sup>g</sup>	125,33 ± 3,61 <sup>a</sup>
T2	0,05 ± 0,005 <sup>b</sup>	20,93 ± 0,48 <sup>b</sup>	8,74 ± 1,10 <sup>b</sup>	35,81 ± 3,35 <sup>f</sup>	2,24 ± 0,13 <sup>d</sup>
T3	0,05 ± 0,003 <sup>b</sup>	14,02 ± 2,79 <sup>c</sup>	9,66 ± 1,70 <sup>b</sup>	56,70 ± 2,67 <sup>e</sup>	3,42 ± 0,28 <sup>cd</sup>
T4	0,04 ± 0,003 <sup>b</sup>	4,11 ± 0,79 <sup>e</sup>	7,12 ± 0,82 <sup>b</sup>	83,03 ± 1,90 <sup>c</sup>	2,14 ± 0,33 <sup>d</sup>
T5	0,05 ± 0,004 <sup>b</sup>	22,32 ± 2,52 <sup>b</sup>	8,67 ± 0,53 <sup>b</sup>	155,57 ± 2,09 <sup>a</sup>	2,96 ± 0,11 <sup>d</sup>
T6	0,08 ± 0,009 <sup>a</sup>	17,79 ± 2,65 <sup>bc</sup>	9,12 ± 0,72 <sup>b</sup>	12,43 ± 1,51 <sup>h</sup>	14,96 ± 1,35 <sup>b</sup>
T7	0,04 ± 0,002 <sup>b</sup>	14,10 ± 2,37 <sup>c</sup>	8,38 ± 1,03 <sup>b</sup>	31,66 ± 2,88 <sup>f</sup>	6,26 ± 2,99 <sup>c</sup>
T8	0,05 ± 0,005 <sup>b</sup>	10,60 ± 1,12 <sup>d</sup>	7,94 ± 0,50 <sup>b</sup>	76,00 ± 2,92 <sup>d</sup>	3,09 ± 1,38 <sup>d</sup>
T9	0,04 ± 0,002 <sup>b</sup>	10,48 ± 2,42 <sup>d</sup>	7,58 ± 0,20 <sup>b</sup>	109,71 ± 1,72 <sup>b</sup>	3,79 ± 0,58 <sup>cd</sup>

\*Média de três repetições ± desvio padrão. Onde ES = espessura; S = solubilidade; PVA = permeabilidade ao vapor de água; RT = resistência à tração; E = alongação. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2.1 Espessura

A espessura dos filmes de isolado proteico com gelatina estão demonstradas na Tabela 4.2, podendo-se observar que as amostras apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que a composição influenciou esta propriedade, mesmo havendo uma padronização de 30 mL de solução filmogênica nas placas de petri. Os filmes com as maiores espessuras (0,009 mm e 0,008 mm) foram verificados nos tratamentos 1 (3,0 g de isolado proteico e 0,6 g de glicerol) e tratamento 6 (3,0g de isolado proteico, 0,6g de sorbitol), respectivamente, sendo estes, os tratamentos com maior concentração de isolado proteico e plastificante. A menor espessura (0,004 mm), foram observadas nos tratamentos 4 (0,75 g de isolado proteico, 2,25 g de gelatina e 0,15 g de glicerol), 7 (2,25 g de isolado proteico, 0,75 g de gelatina e 0,45 g de sorbitol) e 9 (0,75 g de isolado proteico, 2,25 g de gelatina e 0,15 g de sorbitol).

Segundo Melo et al., (2017), a espessura pode ser influenciada pela quantidade e tipo de componentes da matriz polimérica, técnica de preparo, tipo de solvente utilizado, dentre outros fatores.

Nakashima et al., (2016) em seus estudos com filmes de colágeno com adição de óleo essencial de cravo da Índia, observaram valores que variaram entre 0,02 e 0,04 mm. Estes valores são inferiores aos encontrados neste estudo, devido a concentração de isolado proteico utilizada na solução filmogênica.

#### **4.3.2.2 Solubilidade**

A solubilidade de filmes é uma análise importante para a determinação da afinidade à água da matéria prima, tendo em vista que a maioria dessas películas são elaboradas com materiais hidrofílicos (MALI et al., 2010), como o isolado proteico.

A solubilidade dos filmes proteicos com gelatina variou de 4,11% a 28,72%, conforme Tabela 4.2. Esta é uma característica desejável para os filmes desse estudo, demonstrando que os mesmos podem ser aplicados diretamente aos produtos. Para determinadas aplicações, os filmes não podem apresentar-se solúveis em água para evitar danos no produto a ser protegido. Conforme Kim et al., (2015), quando uma película comestível é exposta à água, as ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas se dissociam por competição com moléculas de água, o que resulta na deformação e na dissolução do filme.

A utilização de plastificante, em particular o glicerol, tem influência direta sobre a solubilidade de filmes de amido, visto que interage com a matriz do filme, aumentando o espaço livre entre as cadeias, promovendo a entrada da água no filme e, conseqüentemente, aumentando sua solubilidade (MATTA JUNIOR et al., 2011). Este fato pode ser observado no tratamento 1 (Tabela 4.2), no qual ocorreu um aumento da solubilidade em alto teor de glicerol.

Santos (2004) e Faria et al., (2012), em seus estudos com filmes a base de proteínas; amido e polpa de acerola, encontraram respectivamente, 11% e 16,82%, esses valores estão próximos aos que foram obtidos nestes estudos. No entanto, Fakhouri et al., (2015), em estudos com filmes a base de polissacarídeos, obtiveram 49% de solubilidade, valor este, superior ao do presente estudo.

#### **4.3.2.3 Permeabilidade ao vapor de água**

A permeabilidade ao vapor de água é definida pela Norma ASTM E96-95 como a taxa de transmissão de vapor de água através da unidade de área do material plano, a uma determinada espessura, induzida pela diferença de pressão de vapor entre duas superfícies

específicas, sob condições de temperatura definidas, ou seja, é a medida da facilidade com que um material pode ser penetrado pelo vapor de água. (ASTM E96-95, 1995). Esta análise é fundamental para compreender o comportamento dos filmes poliméricos, visto que a água está presente tanto nos filmes quanto nos produtos aos quais serão aplicados.

Fatores como o próprio polímero, a área exposta à permeação e a espessura podem afetar a permeabilidade do filme. Nesse caso, a espessura deve ser inversamente proporcional à permeabilidade (SARANTÓPOULOS et al., 2002). No entanto, pode-se observar neste trabalho, que o aumento da espessura está diretamente proporcional à PVA, onde verificou-se uma variação de 7,12 a 16,36 g.mm kPa<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> (Tabela 4.2).

Permeabilidade ao vapor de água de 3,2 a 5,5 g.mm kPa<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> foram relatados em filmes nanocompósitos obtidos de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*) e montmorilonita por Cortez-Vega et al., (2013), valores estes, inferiores aos obtidos no presente estudo.

O aumento do espaçamento entre as cadeias, devido à inclusão adicional de moléculas entre as cadeias de polímeros podem promover aumento na permeabilidade ao vapor de água através do filme e, portanto, acelerar a transmissão do vapor de água. Este fato foi observado por outros autores como Bertan et al., (2005) em filmes de gelatina e ácido láurico, onde o aumento da espessura dos filmes provoca uma elevação da PVA. A influência do aumento da PVA em relação à espessura também foi verificada por Jiang et al., (2016) em filmes de fécula de batata. Sobral, (1999), em filmes com gelatina, constataram que o aumento da espessura dos filmes provoca um aumento da PVA, da força na ruptura e na cor dos mesmos.

McHugh; Krochta (1994) descreveram em seus estudos que o aumento na concentração de glicerol induz ao aumento da permeabilidade aos gases de filmes hidrofílicos, quando o glicerol se liga às moléculas do biopolímero, aumenta a mobilidade e diminui a densidade entre as suas moléculas, facilitando a transmissão dos gases através do material.

#### **4.3.2.4 Resistência à tração e alongação**

As propriedades mecânicas dos filmes dependem intimamente da formulação (macromoléculas, solventes, plastificantes, ajustadores de pH) e dos procedimentos utilizados para a produção dos mesmos. A concentração de plastificante na formulação é um importante fator capaz de alterar as propriedades mecânicas de um filme. Os plastificantes atuam diminuindo as forças intermoleculares entre as cadeias de amido, causando redução da

temperatura de transição vítrea e, de maneira geral, a resistência cai com o acréscimo da concentração do plastificante (SOBRAL, 2000).

A análise das propriedades mecânicas dos filmes proteicos com gelatina, apresentou valores de resistência à tração entre 12,43 e 155,57 MPa (Tabela 4.2). A adição de gelatina provocou um aumento na resistência à tração em relação à amostra sem adição da mesma. O maior valor de resistência foi observado no tratamento 5 (3,0 g de gelatina) contendo a maior concentração de gelatina.

Melo et al., (2017) obtiveram em estudos com filmes bionanocompósitos à base de pectina e polpa de cacau resultados que variaram entre 15,09 e 60,32 MPa. Este fato foi associado a possível ocupação de parte dos espaços vazios entre as cadeias do polímero pelas nanoestruturas, causando aumento na resistência decorrente de uma maior compactação da matriz.

As propriedades mecânicas de resistência à tração e alongação são características a serem avaliadas em um filme, a primeira tem a função de expressar a força máxima que o filme suporta durante o teste de tração, a segunda se refere a capacidade do mesmo em esticar. De acordo com Gontard et al., (1994), em filmes procura-se alta resistência à tração como observado neste estudo, no entanto, o valor da alongação dependerá da aplicação do filme, pois para manter a sua integridade e propriedades de barreira, o filme deve permitir a tensão normal apresentada durante a sua aplicação, transporte e manuseio.

A alongação na ruptura é uma medida da capacidade do filme para alongamento, também se refere à alteração máxima no comprimento do corpo de prova antes de quebrar. Os valores de alongação obtidos neste trabalho variaram entre 2,14 e 125,33%, apresentando semelhança significativa entre os tratamentos (Tabela 4.2). O glicerol foi a variável que potencializou o parâmetro alongação quando comparado à ação do sorbitol. Alongação variando entre 1,0 e 1,5 % foram relatadas em outros trabalhos com filmes de proteína de soja afetados pela adição de ácido fenólico (INSAWARD et al., 2015), esses valores são inferiores aos obtidos neste trabalho.

#### **4.3.2.5 Cor e opacidade**

A cor e a opacidade do polímero são resultantes da morfologia ou da estrutura química associada à massa molecular do material (CHEN, 1995). Filmes a base de gelatina são transparentes e homogêneos (FAKHOURI et al., 2003), enquanto a adição de lipídios muda a

aparência de filmes de hidrocolóides tornando-os opacos (KAMPER; FENNEMA, 1984). Os valores obtidos só poderam ser considerados bons ou ruins dependendo da aplicação a que será dada ao filme.

**Tabela 4.3** Resultados de cor dos filmes desenvolvidos a partir de resíduos de tilápia e gelatina.

Tratamento	L*	Chroma a*	Chroma b*	Opacidade*	$\Delta E$
1	83,68 $\pm$ 0,43 <sup>f</sup>	1,25 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	27,45 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	21,15 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	88,08 $\pm$ 0,04
2	92,12 $\pm$ 0,50 <sup>e</sup>	0,77 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	12,53 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>	15,65 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>	92,97 $\pm$ 0,32
3	92,89 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	0,68 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	9,41 $\pm$ 0,63 <sup>e</sup>	14,90 $\pm$ 0,41 <sup>e</sup>	93,37 $\pm$ 0,37
4	93,35 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	0,67 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	7,81 $\pm$ 0,23 <sup>g</sup>	14,03 $\pm$ 0,31 <sup>f</sup>	93,68 $\pm$ 0,07
5	93,94 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	4,84 $\pm$ 0,13 <sup>h</sup>	12,64 $\pm$ 0,17 <sup>g</sup>	94,07 $\pm$ 0,09
6	84,72 $\pm$ 1,16 <sup>f</sup>	0,61 $\pm$ 0,36 <sup>bcd</sup>	25,03 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>	18,24 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	88,36 $\pm$ 0,64
7	91,54 $\pm$ 0,39 <sup>e</sup>	0,69 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	13,81 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>	15,02 $\pm$ 0,51 <sup>d</sup>	92,58 $\pm$ 0,42
8	92,49 $\pm$ 0,12 <sup>e</sup>	0,64 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	9,61 $\pm$ 0,48 <sup>d</sup>	14,13 $\pm$ 0,47 <sup>f</sup>	92,99 $\pm$ 0,08
9	93,56 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,61 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	8,31 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>	15,11 $\pm$ 0,48 <sup>d</sup>	93,93 $\pm$ 0,02

\*Média de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão.

$\Delta E$  = diferença de cor.

Os resultados para os parâmetros de cor (L\*, a\*, b\*,  $\Delta E^*$ ) dos filmes de isolado proteico (Tabela 4.3) apresentaram diferença significativa em nível de 5%. Independentemente dos resultados das análises estatísticas, esses filmes puderam ser considerados como de alta coloração ( $\Delta E^* > 4$ ) e opacos ( $Y > 2,5$ ) (VANIN et al., 2005). A luminosidade variou de 83,68 a 93,94, indicando que podem ser considerados claros, pois quanto mais próximo de 100, mais transparentes serão os filmes.

Os filmes apresentaram coloração tendendo para a cor amarelada, como observado no parâmetro b\*, onde os valores aproximam-se de 28 e com tendência para esverdeada, conforme verificado no o parâmetro a\*, este fato está associado à presença do colágeno e isolado proteico que possui coloração característica.

As amostras apresentaram valores de opacidade que variaram entre 12,64 e 21,15 (Tabela 4.3), todas próximas à amostra contendo apenas gelatina.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Foram obtidos filmes homogêneos, contínuos e com boa manuseabilidade. O isolado proteico foi a variável que apresentou maior influência sobre a espessura, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e alongação. Os resultados para espessura demonstraram que o isolado proteico associado à gelatina influenciou significativamente, ao contrário dos plastificantes utilizados nas formulações. Na solubilidade dos filmes, o plastificante glicerol teve influência direta devido a sua interação com a matriz polimérica, aumentando sua solubilidade. Neste trabalho pode-se verificar que o aumento da espessura está diretamente proporcional à permeabilidade ao vapor de água. A adição de gelatina provocou um aumento na resistência à tração em relação à amostra sem adição da mesma. O glicerol foi a variável que potencializou o parâmetro alongação quando comparado à ação do sorbitol. Os filmes apresentaram coloração tendendo para a cor amarelada, podendo ser considerados claros.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ALVES, R. C.; RIBEIRO, P. B.; RICARDO, L. P.; MORAIS, M. M.; ROSA, G. S. Caracterização físico-mecânica de biofilmes comestíveis à base de gelatina e de amidos de milho e mandioca. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. UNICAMP. Campinas – SP. 2015.

ANDRECEUTTI, C.; CARVALHO, R.; GALICIA-GARCIA, T.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; GROSSO, C. R. F. **Food Research Internacional**, 2010.

ASTM- American Society for Testing and Materials. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials: E 96-95, 10p., 1995.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard methods of water vapor transmission of materials. Método: E00996-00. In: ASTM annual book of ASTM standards, p. 907-914, 2000a.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard test methods for tensile properties on thin plastic sheeting. Método: D00882-00. In: ASTM annual book of ASTM standards, p.160-168, 2000b.

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

CARVALHO, A. C. F. B.; LIMA, V. H. C.; PEREIRA, G. T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Revista Higiene**, 16, 89-94, 2002.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, 26, 495-501, 2006.

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

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, 78(11), 2563-2583, 1995.

DIÉGUEZ, M. C. V.; PELISSARI, F. P.; SOBRAL, P. A.; MENEGALLI, F. C. Effect of process conditions on the production of nanocomposite films based on amaranth flour and montmorillonite. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 70-79, 2015.

FAKHOURI, F. M. Coberturas comestíveis aplicadas na preservação de goiabas *in natura* (*Psidium guajava* L.). (2003). 126f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). UNICAMP. Campinas. 2003.

FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M.; CAON, T.; VELASCO, J. I.; INNOCENTINI-MEI, L. H. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, 109, 5764, 2015.

FARIA, M. G.; FAKHOURI, F. M.; CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighia marginata* D.C.). **Química Nova**, 35(3), 546-552, 2012.

FARIAS, M. G.; CARVALHO, C. W. P.; TAKEITI, C. Y.; ASCHERI, J. L. R. O efeito da permeabilidade ao vapor de água, atividade de água, molhabilidade e solubilidade em água em filmes de amido e polpa de acerola. VI Workshop da Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza. 2012.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In: Krochta, J. M., Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. (eds). *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA, 1994.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; CATALÁ, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. The potential of proteins for producing food packaging materials: a review. **Packaging Technology and Science**, 29, 203-224, 2016.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, 57, 190-199, 1992.

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

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

HUNTERLAB. The color management company. Universal software, version 3.2. Reston, 1997.

INSAWARD, A.; DUANGMAL, K.; MAHAWANICH, T. Mechanical, optical and barrier properties of soy protein film as affected by phenolic acid addition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63, 9421-9426, 2015.

JIANG, S.; LIU, C.; WANG, X.; XIONG, L.; SUN, Q. Physicochemical properties of starch nanocomposite films enhanced by self-assembled potato starch nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, 69, 251-257, 2016.

KAMPER, S. L.; FENNEMA, O. Water vapor permeability of an edible, fatty acid bilayer film. **Journal of Food Science**, 49, 1482-1485, 1984.

KIM, S. R. B.; CHOI, Y. G.; KIM, J. Y.; LIM, S. T. Improvement of water solubility and humidity stability of tapioca starch film by incorporating various gums. **LWT - Food Science and Technology**, 64, 475-482, 2015.

KUNTE, L. A.; GENNADIOS, A.; CUPPETT, S. L.; HANNA, M. A.; WELLER, C. L. Cast films from soy protein isolates and fractions. **Cereal Chemistry**, 74, 115-118, 1997.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Starch films: production, properties and potential of utilization. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(1), 137-156, 2010.

MATTA JUNIOR, M. D.; SARMENTO, S. B. S.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ZOCCHI, S. S. Barrier properties of films of pea starch associated with xanthan gum and glycerol. **Polímeros**, 21(1), 67-72, 2011.

MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs glycerol – plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42(4), 841-845, 1994.

MELO, P. T. S.; AOUADA, F. A.; MOURA, M. R. Production of nanocomposite films of pectin based on cocoa puree with potential use as packaging for food. **Química Nova**, 40(3), 247-251, 2017.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. Extraction and properties of Nile tilapia myofibrillar proteins for edible films. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(1), 179-189, 2000.

PIMENTEL, T.; PIZZUTI, L.; FAKHOURI, F. M.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; FONSECA, G. G. Development of multilayer films obtained from epoxidized methyl esters, polyhydroxyalkanoates and their combinations. **Journal of Polymers and the Environment**, 26, 1661-1672, 2018.

SANTOS, P. V. Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 252 p., 2004.

SARANTÓPOULOS, G. I. G.; OLIVEIRA, L. M.; COLTRO, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. Embalagens plásticas flexíveis. Principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas, CETEA/ITAL, 267p, 2002.

SOBRAL, P. J. A. *Ciência e Eng.* 8, 60. 1999.

SOBRAL, P. J. A. Thickness effects of myofibrillar protein based edible films on their functional properties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35, 1251-1259, 2000.

SOUSA, G. M. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás- UFG, 89 p., 2012.

SUPPAKUL, P.; CHALERNSOOK, B.; RATISUTHAWAT, B.; PRAPASITTHI, S.; MUNCHUKANGWAN, N. Empirical modeling of moisture sorption characteristics and 36 mechanical and barrier properties of cassava flour film and their relation to plasticizing/antiplasticizing effects. **LWT - Food Science and Technology**, 50, 290-297, 2013.

TANADA-PALMU, P. S.; HÉLEN, H.; HYVÖNEN, L. Preparation, properties and applications of wheat gluten edible films. **Journal of Agricultural Food Science**, 9, 23-35, 2000.

THOMAZINE, M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. **Journal of Food Science**, 70 (3), 172-176, 2005.

VANIN, F. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; CARVALHO, R. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, 19, 899-907, 2005.

ZAVAREZE, E. R.; HALAL, S. L. M.; TELLES, CAMPOLLO, A.; PRENTICE, C. H. Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Brazilian Journal of Food Technology**, 15, 53-57, 2012.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Visando-se testar a composição de filmes proteicos com nanoargila e óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano e filmes proteicos com gelatina, os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

1. O isolado proteico apresenta alto potencial para a produção de filmes biodegradáveis.
2. Os filmes proteicos produzidos apresentaram-se promissores no ponto de vista da aparência visual, manuseabilidade e continuidade;
3. Em relação à solubilidade, os filmes com nanoargila e óleos essenciais apresentaram alta solubilidade e baixa permeabilidade ao vapor de água, resistência à tração e alongação quando comparados aos filmes proteicos com gelatina.
4. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que pode haver uma continuação em estudos futuros que visem a melhoria das características dos filmes biodegradáveis, assim como a sua aplicação na indústria.
5. Pode-se também concluir que a utilização da proteína de tilápia poderia agregar lucros para as indústrias processadoras reduzindo desta forma, os impactos ambientais gerados pelo descarte inadequado.