

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Obtenção, Caracterização e Comparação de Filmes à Base de
Proteínas do Soro de Leite**

TESE DE DOUTORADO

Gabriela Leticia de Jesus

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Obtenção, Caracterização e Comparação de Filmes à Base de
Proteínas do Soro de Leite**

Gabriela Leticia de Jesus

Tese de doutorado apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e
Operações Unitárias

Orientadores:

Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Tessaro – UFRGS/BR

Prof. Dr. Nilson Romeu Marcílio – UFRGS/BR

Co-orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Camila Baldasso – UCS/BR

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese *Obtenção, Caracterização e Comparação de Filmes à Base de Proteínas do Soro de Leite*, elaborada por Gabriela Leticia de Jesus como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr^a. Débora Jung Luvizetto Faccin – UFRGS

Dr^a. Cláudia Leites Luchese – UFRGS

Prof. Dr. Marcelo Giovanela – UCS

Resumo

O desenvolvimento de embalagens comestíveis e biodegradáveis tem ganhado atenção intensa dos pesquisadores durante as últimas décadas, que vêm estudando novos materiais provenientes de fontes renováveis como alternativa às embalagens plásticas sintéticas. Como uma fonte de proteínas para o desenvolvimento de embalagens, o soro de leite, líquido remanescente da fabricação de queijo, tem se mostrado promissor nesse setor. A incorporação de proteínas do soro de leite confere à embalagem características como transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para consumo. Frente a isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade de obtenção de filmes de diferentes formulações à base de proteínas do soro de leite através da técnica de *casting*. Com o intuito de comparar os resultados obtidos foram utilizadas três fontes de proteína do soro de leite: soro de leite desmineralizado (WP), proteína concentrada (WPC) e proteína isolada (WPI). Ainda foram usados gelatina, água como solvente, glicerol como plastificante e aditivos (quitosana, nano-quitosana e óleo de semente de uva). Os filmes obtidos foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, físicas, morfológicas, químicas, de barreira e térmicas. Foi possível a obtenção de filmes à base de WPI com concentrações de glicerol de 30-70 % (m/m seca de proteína) e a incorporação de baixas concentrações de óleo de semente de uva (1 % e 10 %) revelou melhorias na permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, umidade e hidrofobicidade do material. A obtenção de filmes à base de WPC foi dificultada provavelmente em decorrência da presença de caseína em sua composição. Em função disso, optou-se por não dar seguimento dos experimentos com os filmes obtidos com essa proteína. Películas de WP com gelatina foram alcançadas com a utilização de glicerol e gelatina na concentração de 10-30 % e 100 % (m/m seca de proteína), respectivamente, sem e com adição de quitosana ou nano-quitosana. Tendo como base a comparação realizada entre as formulações, foi observado que os filmes à base de WP apresentaram resultados satisfatórios e muitas vezes superiores aos filmes à base de WPI. Além disso, observou-se que as formulações à base de WP e WPI podem ser armazenadas sob refrigeração por período prolongado de estoque ou tempo de armazenamento. Comprovou-se também a biodegradabilidade dos mesmos, sendo que o filme à base de soro de leite exibiu a mais rápida degradação, de apenas uma semana. A aplicação em queijo minas frescal acarretou uma redução do crescimento microbiano e prolongamento da vida útil do alimento. Esses resultados são promissores, uma vez que muitos estudos focam no uso de WPC e WPI em embalagens e há pouca literatura referente à aplicação do soro de leite desmineralizado, que

representa uma alternativa sustentável. Com base nos resultados obtidos, a formulação contendo 3 % m/V de WP, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana foi selecionado com o a melhor formulação.

Palavras chave: soro de leite desmineralizado; óleo de semente de uva; biodegradabilidade; armazenamento; queijo minas frescal.

Abstract

The development of edible and biodegradable packaging has gained intense attention from researchers during the last decades, who have been studying new materials from renewable sources as an alternative to synthetic plastic packaging. As a source of protein for the development of packaging, whey, the liquid remaining from cheesemaking, has shown promise in this sector. The incorporation of whey proteins gives the package characteristics such as transparency, flexibility, absence of odor and taste, favoring its acceptability for consumption. In view of this, the objective of this work is to evaluate the ability to obtain films of different formulations based on whey proteins through the casting technique. In order to compare the results obtained, three sources of whey protein were used: demineralized whey (WP), concentrated protein (WPC) and isolated protein (WPI). Gelatin, water as a solvent, glycerol as a plasticizer and additives (chitosan, nano-chitosan and grape seed oil) were also used. The films obtained were characterized in terms of mechanical, physical, morphological, chemical, barrier and thermal properties. It was possible to obtain WPI-based films with glycerol concentrations of 30-70 % (dry w/w of protein) and the incorporation of low concentrations of grape seed oil (1 % and 10 %) revealed improvements in permeability water vapor, water solubility, moisture and hydrophilicity of the material. Obtaining WPC-based films was probably made more difficult due to the presence of casein in its composition. As a result, it was decided not to continue the experiments with the films obtained with this protein. WP-based films with gelatin were achieved with the use of glycerol and gelatin in the concentration of 10-30 % and 100 % (dry w/w of protein), respectively, without and with the addition of chitosan or nano-chitosan. Based on the comparison made between the formulations, it was observed that the films based on WP showed satisfactory results and many times superior to the films based on WPI. In addition, it was observed that formulations based on WP and WPI can be stored under refrigeration for an extended period of stock or storage time. Their biodegradability was also proven, and the whey-based film exhibited the fastest degradation, in just one week. The application in minas frescal cheese reduced microbial growth and prolonged the shelf life of the food. These results are promising, since many studies focus on the use of WPC and WPI in packaging and there is little literature regarding the application of demineralized whey, which represents a sustainable alternative. Based on the results obtained,

the formulation containing 3 % w/V of WP, 20 % w/w (dry mass / whey mass) of glycerol, 3 % w/V gelatin and 0.3 % w/w of chitosan was selected with the best formulation.

Keywords: demineralized whey; grape seed oil; biodegradability; storage; minas frescal cheese.

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvi
Capítulo 1	1
Introdução	1
Capítulo 2	4
Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica	4
2.1 Princípios da Embalagem de Alimentos	4
2.1.1 Funções da embalagem	4
2.1.2 Requisitos para embalagem de alimentos.....	4
2.1.3 Propriedades da embalagem.....	5
2.1.3.1 Permeabilidade.....	5
2.1.3.2 Migração	7
2.1.3.3 Transmissão de luz.....	8
2.1.3.4 Resistência mecânica	10
2.1.4 Degradação biológica natural.....	13
2.1.5 Envelhecimento acelerado.....	15
2.1.6 Considerações ambientais	15
2.2 Embalagens Comestíveis e Biodegradáveis	16
2.2.1 Embalagens à base de soro do leite	17
2.2.1.1 Características do soro de leite.....	18
2.2.1.2 Composição química.....	19
2.2.1.3 Produtos derivados do soro de leite.....	21
2.2.2 Embalagens à base de gelatina	23
2.2.2.1 Características da gelatina.....	24
2.2.2.2 Produtos derivados da gelatina.....	25
2.2.3 Embalagens à base de soro de leite e gelatina	26
2.3 Aditivção de filmes	27
2.3.1 Glicerol	28
2.3.2 Quitosana	29
2.3.3 Óleo de semente de uva.....	29

2.4	Comportamento dos filmes	30
2.5	Aplicações dos filmes comestíveis.....	31
2.5.1	Questões de pesquisa.....	34
Capítulo 3	36
Materiais e Métodos	36
3.1	Materiais	36
3.2	Caracterização das matéria-primas.....	37
3.2.1	Composição química.....	37
3.2.2	Eletroforese em gel	39
3.2.3	Caracterização química	39
3.2.4	Análises térmicas	40
3.2.4.1	Calorimetria diferencial de varredura.....	40
3.2.4.2	Termogravimetria.....	40
3.3	Preparação dos aditivos.....	40
3.3.1	Quitosana	40
3.3.2	Nano-quitosana	41
3.4	Preparação da solução filmogênica	41
3.5	Obtenção dos filmes.....	43
3.6	Caracterização dos filmes	44
3.6.1	Propriedades mecânicas	44
3.6.2	Propriedades físicas.....	44
3.6.2.1	Espessura.....	44
3.6.2.2	Gramatura	44
3.6.2.3	Opacidade	44
3.6.2.4	Solubilidade em água e em etanol.....	45
3.6.2.5	Umidade	45
3.6.2.6	Ângulo de contato	45
3.6.3	Propriedades morfológicas.....	45
3.6.4	Caracterização química	45
3.6.5	Propriedades de barreira.....	46
3.6.6	Análises térmicas	46
3.6.6.1	Calorimetria diferencial de varredura.....	46
3.6.6.2	Termogravimetria.....	46

3.7	Teste de vida de prateleira.....	46
3.7.1	Análise visual.....	47
3.7.2	Ângulo de contato	47
3.7.3	Espessura, propriedades mecânicas e opacidade.....	47
3.8	Teste de envelhecimento acelerado.....	47
3.8.1	Massa residual.....	47
3.9	Teste de biodegradabilidade (degradação biológica)	48
3.9.1	Preparação do ambiente para biodegradabilidade	48
3.9.2	Monitoramento do solo	48
3.9.3	Teste do algodão	49
3.9.4	Avaliação da biodegradabilidade dos filmes.....	49
3.10	Teste em alimento	51
3.10.1	Análise direta do queijo minas frescal	51
3.10.2	Análise indireta do queijo minas frescal	52
3.10.3	Análises microbiológicas e físico-químicas das amostras de queijo	52
3.10.3.1	Análise microbiológica	53
3.10.3.2	Acidez total titulável	54
3.10.3.3	pH.....	54
3.10.3.4	Análises dos filmes	54
3.11	Análise estatística.....	55
Capítulo 4		56
Resultados e Discussão.....		56
4.1	Caracterização das matérias-primas	56
4.2	Viscosidade das soluções filmogênicas.....	62
4.3	Propriedades dos filmes	65
4.3.1	Caracterização dos filmes.....	65
4.3.1.1	Propriedades mecânicas	66
4.3.1.2	Propriedades físicas.....	69
4.3.1.3	Propriedades morfológicas.....	74
4.3.1.4	Estrutura química	79
4.3.1.5	Propriedades de barreira.....	82
4.3.1.6	Análises térmicas	85
4.3.1.7	Seleção da melhor formulação	89

4.4	Comparação entre os filmes	90
4.5	Teste de vida de prateleira.....	92
4.5.1	Análise visual.....	92
4.5.2	Ângulo de contato	96
4.5.3	Espessura.....	97
4.5.4	Propriedades mecânicas	98
4.5.5	Opacidade	99
4.5.6	Considerações sobre o tempo de armazenamento	100
4.6	Teste de envelhecimento acelerado.....	100
4.6.1	Caracterização química	101
4.6.2	Análise térmica	103
4.6.3	Considerações sobre o envelhecimento acelerado.....	104
4.7	Teste de biodegradabilidade.....	105
4.7.1	Monitoramento do solo	105
4.7.2	Teste do algodão	106
4.7.3	Avaliação da biodegradabilidade dos filmes.....	107
4.7.3.1	Análise visual.....	108
4.7.3.2	Perda de massa.....	111
4.7.3.3	Caracterização química	113
4.7.4	Considerações sobre a biodegradabilidade dos filmes	115
4.8	Aplicação dos filmes em alimento	115
4.8.1	Análise direta	115
4.8.1.1	Análise microbiológica	115
4.8.1.2	Perda de massa do alimento	117
4.8.1.3	Acidez total titulável	118
4.8.1.4	pH.....	119
4.8.1.5	Análise visual.....	120
4.8.2	Análise indireta	123
4.8.2.1	Análise microbiológica	123
4.8.2.2	Perda de massa do alimento	124
4.8.2.3	Acidez total titulável	124
4.8.2.4	pH.....	125
4.8.2.5	Análise visual.....	126
4.8.2.6	Análises dos filmes	127

4.8.2.7	Considerações sobre aplicação dos filmes em alimentos	127
Capítulo 5	129
5.1	Conclusões	129
Referências	133
Apêndice A	153
	Filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina	153
A.1	Caracterização dos filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina	153
A.2	Propriedades mecânicas	153
A.3	Propriedades físicas.....	154
A.4	Propriedades morfológicas.....	156
A.5	Caracterização química	157
A.6	Propriedades de barreira.....	158
A.7	Análises térmicas	159
A.8	Seleção da melhor formulação	161
Apêndice B	162
	Caracterizações das demais formulações dos filmes à base de soro de leite e gelatina e dos filmes à base de WPI	162
	Propriedades morfológicas.....	162
	Caracterização química	164
	Análise térmica	166
Apêndice C	168
	Análises termogravimétricas - envelhecimento acelerado	168
Apêndice D	169
	Análise estatística – teste em alimento.....	169

Lista de Figuras

Figura 2.1 Curvas típicas de tensão × deformação. (a) material duro quebradiço, (b) material duro e resistente, (c) material elástico, (d) material macio e fraco e (e) material macio e resistente. Fonte: adaptado de Chen (1995).....	11
Figura 2.2 Curva tensão × deformação de um filme à base de proteína. Fonte: adaptado de Chen (1995).	12
Figura 2.3 Curva tensão × deformação de diferentes filmes comestíveis. Fonte: adaptado de Chen (1995).	12
Figura 2.4 Alternativas para o processamento do soro de leite. Fonte: adaptado de Bylund (1995).....	22
Figura 3.1 Fluxograma esquemático da sequência de experimentos.	36
Figura 3.2 Ilustração do procedimento de preparação da solução filmogênica dos filmes à base de soro de leite desmineralizado e gelatina.....	42
Figura 3.3 Ilustração do procedimento de preparação da solução filmogênica à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina.....	42
Figura 3.4 Ilustração do procedimento de preparação da solução filmogênica à base de proteína isolada do soro de leite.	43
Figura 3.5 Imagem da embalagem de material composto de polipropileno utilizada como suporte de amostras.....	49
Figura 3.6 Imagem das amostras dispostas em copos transparentes (A) e ilustração da posição da amostra no sistema copo, solo e amostra (B).....	50
Figura 3.7 Imagens da estufa agrícola utilizada para o acondicionamento das amostras.	50
Figura 3.8 Imagem do alimento na embalagem (A) e do lote (B) utilizados.	51
Figura 3.9 Imagem das amostras de queijo minas frescal para o teste em alimento com aplicação direta.	52
Figura 3.9 Imagem das amostras de queijo minas frescal para o teste em alimento com aplicação indireta.	52
Figura 4.1 Fotografia dos géis de eletroforese SDS-PAGE. Legenda: (1) marcador de massa molar, (2) soro de leite desmineralizado, (3) WPI e (4) WPC.	58
Figura 4.2 Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das amostras de (A) soro do leite, (B) WPC, (C) WPI, (D) gelatina, (E) glicerol e (F) OSU.	59
Figura 4.3 Curvas de TGA e de DTG das amostras de (A) soro do leite, (B) WPC, (C) WPI, (D) gelatina, (E) glicerol e (F) OSU.	61
Figura 4.4 Fotografias das medidas de ângulo de contato para os diferentes filmes à base de soro de leite e gelatina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	74

Figura 4.5 Fotomicrografias de filmes à base de soro de leite e gelatina sem e com adição de quitosana, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) S3G10Gel3 e (B) S3G10Gel3Q.	76
Figura 4.6 Fotomicrografias da seção transversal de filmes à base de WPI sem e com adição de OSU, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) I10G50, (B) I10G50UV10 e (C) I10G70UV40.	78
Figura 4.7 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do filme à base de soro de leite e gelatina de formulação S3G10Gel3.	81
Figura 4.8 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do filme à base de WPI de formulação I10G50.	82
Figura 4.9 Termograma TGA e DTG do filme S3G10Gel3 à base de soro de leite e gelatina.	87
Figura 4.10 Termograma TGA e DTG do filme I10G50.	89
Figura 4.11 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) dos filmes. (A) S3G20Gel3Q, (B) I10G50 e (C) I10G50UV20, antes e após exposição ao envelhecimento acelerado por períodos de 80, 160, 240, 360 e 480 h.	102
Figura 4.12 Monitoramento da umidade do solo simulado durante o período de maturação do solo.	105
Figura 4.13 Monitoramento da temperatura e umidade durante a realização dos testes de biodegradabilidade. (A) Temperatura média ambiente, estufa e solo para os filmes S3G20Gel3Q, (B) umidade média ambiente, estufa e solo para o filme S3G20Gel3Q, (C) temperatura média ambiente, estufa e solo para os filmes I10G50 e I10G50UV10 e (D) umidade média ambiente, estufa e solo para os filmes I10G50 e I10G50UV10.	107
Figura 4.14 Imagens obtidas diariamente dos filmes S3G20Gel3Q durante o teste de biodegradabilidade.	108
Figura 4.15 Imagens obtidas semanalmente dos filmes I10G50 durante o teste de biodegradabilidade.	110
Figura 4.16 Imagens obtidas semanalmente dos filmes I10G50UV10 durante o teste de biodegradabilidade.	111
Figura 4.17 Monitoramento das massas dos filmes durante o experimento de degradação. (A) Variação diária da massa do filme S3G20Gel3Q, (B) variação semanal da massa do filme I10G50 e (C) variação semanal da massa do filme I10G50UV10.	112
Figura 4.18 Espectros de FTIR dos filmes antes e após exposição ao solo simulado. (A) S3G20Gel3Q, (B) I10G50 e (C) I10G50UV10.	114
Figura 4.19 Perda de massa das amostras de queijo minas frescal no teste de recobrimento direto com os filmes selecionados e com filme à base de PVC, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	118
Figura 4.20 Acidez total titulável das amostras de queijo minas frescal no teste de recobrimento com as soluções filmogênicas I10G50, I10G50UV10, S3G20Gel3Q, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	119

Figura 4.21 pH das amostras de queijo minas frescal no teste de recobrimento com as soluções filmogênicas I10G50, I10G50UV10, S3G20Gel3Q, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	120
Figura 4.22 Perda de massa das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	124
Figura 4.23 Acidez total titulável das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).....	125
Figura 4.24 pH das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	125

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Dados de alongamento na ruptura (ϵ_b), tensão na ruptura (σ_b) e espessura de diferentes filmes obtidos na literatura.	13
Tabela 2.2 Distribuição percentual média das proteínas do leite no soro (20 %).....	19
Tabela 2.3. Aplicações de filmes à base de soro de leite para a preservação de frutas.....	32
Tabela 3.1 Materiais utilizados na execução dos experimentos.....	37
Tabela 4.1 Composição química do soro de leite, WPC e WPI em base úmida.....	56
Tabela 4.2 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) do soro de leite, WPC, WPI, gelatina, glicerol e óleo de semente de uva.	60
Tabela 4.3 Viscosidade de diferentes formulações de filmes à base de soro de leite e gelatina.....	62
Tabela 4.4 Viscosidade de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina.....	63
Tabela 4.5 Viscosidade de diferentes formulações de filmes à base de WPI, glicerol e OSU.	63
Tabela 4.6 Composição de WP, glicerol, gelatina e aditivos (quitosana, nano-quitosana) das diferentes formulações de filmes à base de soro de leite que formaram filmes.....	64
Tabela 4.7 Composição de WPC, glicerol, gelatina e aditivos (quitosana, nano-quitosana) das diferentes formulações à base proteína concentrada de soro de leite que formaram filmes.	64
Tabela 4.8 Composição de WPI, glicerol e óleo de semente de uva das diferentes formulações à base proteína isolada de soro de leite que formaram filmes.....	65
Tabela 4.9 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ϵ_b) e tensão na ruptura (σ_b) de diferentes formulações de filmes à base de soro de leite e gelatina com e sem adição de quitosana e nano-quitosana. Espessura média: $69,3 \pm 7,5 \mu\text{m}$	66
Tabela 4.10 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ϵ_b) e tensão na ruptura (σ_b) dos filmes à base de WPI para diferentes formulações. Espessura média: $216 \pm 28 \mu\text{m}$	68
Tabela 4.11 Espessura, gramatura e opacidade de filmes à base de soro de leite e gelatina preparados com diferentes formulações.	69
Tabela 4.12 Espessura, gramatura e opacidade de filmes à base de WPI preparados com diferentes formulações.	70
Tabela 4.13 Solubilidade em água, solubilidade em etanol e umidade para filmes à base de soro de leite e gelatina preparados com diferentes formulações.....	71
Tabela 4.14 Solubilidade em água, solubilidade em etanol, umidade e ângulo de contato de filmes à base de WPI preparados com diferentes formulações.....	73

Tabela 4.15 Permeabilidade ao vapor de água de filmes à base de soro do leite e gelatina preparados com diferentes formulações.	83
Tabela 4.16 Permeabilidade ao vapor de água de filmes à base de WPI preparados a partir de diferentes formulações.	84
Tabela 4.17 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) para filmes à base de soro do leite e gelatina preparados a partir de diferentes formulações.....	86
Tabela 4.18 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) de filmes à base de WPI preparados a partir de diferentes formulações.....	88
Tabela 4.19 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ϵ_b) e tensão de ruptura (σ_b) dos melhores filmes selecionados.	90
Tabela 4.20 Espessura, gramatura e transparência dos melhores filmes selecionados.	91
Tabela 4.21 Solubilidade em água, solubilidade em etanol e umidade dos melhores filmes selecionados.	91
Tabela 4.22 Permeabilidade ao vapor de água dos melhores filmes selecionados.	91
Tabela 4.23 Aspecto visual dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero a seis meses.....	93
Tabela 4.24 Aspecto visual dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) por um período de zero a seis meses.	95
Tabela 4.25 Ângulo de contato (°) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero seis meses.....	96
Tabela 4.26 Espessura (μm) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e $23 \pm 2\%$ de UR) por um período de seis meses.	97
Tabela 4.27 Alongamento na ruptura (%) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero a seis meses.	98
Tabela 4.28 Tensão de ruptura (MPa) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero a seis meses.	99
Tabela 4.29 Opacidade (A_{600}/mm) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero seis meses.....	100

Tabela 4.30 Faixa de degradação, temperatura máxima de degradação (T_{max}) e perda de massa dos filmes antes e após exposição ao envelhecimento acelerado por períodos de 80, 160, 240, 360 e 480 h.....	104
Tabela 4.31 Parâmetros analisados do solo simulado, antes e após o experimento de biodegradação.	106
Tabela 4.32 Análise microbiológica das amostras de queijo minas frescal sem e com recobrimento utilizando os filmes selecionados e por plástico comercial, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	116
Tabela 4.33 Aspecto visual das amostras de queijo minas frescal no teste de recobrimento direto pelas soluções filmogênicas S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).....	121
Tabela 4.34 Aspecto visual das amostras de queijo minas frescal com recobrimento direto pelas soluções filmogênicas S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	122
Tabela 4.33 Análise microbiológica das amostras de queijo minas frescal com aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, de filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).	123
Tabela 4.36 Aspecto visual das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta com os filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).....	126
Tabela 4.37 Análise dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 antes e após realização do teste de alimento indireto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).....	127

Capítulo 1

Introdução

As indústrias estão cada vez mais buscando minimizar os efeitos nocivos gerados pela grande quantidade de embalagens utilizadas em alimentos, substituindo os materiais à base de polímeros sintéticos por materiais biodegradáveis, como uma alternativa ambientalmente correta. Além das vantagens ambientais, os filmes à base de biopolímeros podem também melhorar a qualidade dos alimentos. Publicações recentes mostram o desempenho destas embalagens biodegradáveis na preservação de frutas e verduras minimamente processadas, como barreira à umidade e gases.

A embalagem de um alimento deve preservar as suas características físicas, organolépticas, nutricionais e sanitárias durante o período de estocagem, transporte e comercialização. O desenvolvimento de embalagens comestíveis e biodegradáveis tem recebido atenção intensa dos pesquisadores durante as últimas décadas, que vêm estudando novos materiais provenientes de fontes renováveis como alternativa às embalagens plásticas sintéticas, entre esses materiais destacam-se as proteínas. As funções primordiais dos filmes e coberturas proteicas são controlar a transferência de massa, servir como transportador de ingredientes e aditivos, proporcionar proteção mecânica e melhorar a atração sensorial. A formação e as características dos filmes dependem dos constituintes de sua formulação e das condições de processo.

O soro de leite é a solução remanescente após a precipitação da gordura e das caseínas do leite durante a fabricação de queijo, sendo considerado uma fonte de proteínas. Em média, são utilizados 10 litros de leite para a produção de um quilograma de queijo, gerando assim, aproximadamente 9 litros de soro. O soro é considerado o subproduto mais importante da indústria de laticínios, não apenas pelo grande volume gerado como também por sua alta carga orgânica. Como exemplo do seu poder poluidor, em média, cada tonelada de soro não tratado descartado por dia equivale à poluição de cerca de 470 pessoas.

Devido à alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), o soro de leite, quando considerado resíduo e despejado junto com os demais resíduos líquidos das indústrias de laticínios, pode significar a duplicação do sistema de tratamento de efluentes. Por apresentar

alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio, sua estabilização por métodos convencionais de tratamento biológico é dificultada.

Apesar da crescente utilização do soro de leite na indústria alimentícia em função das suas propriedades nutricionais e tecnológicas, este produto ainda é considerado um resíduo da fabricação de queijo, principalmente em laticínios de pequeno e médio porte, sendo incorporado às estações de tratamento de efluentes, descartado em cursos d'água ou destinado à alimentação animal. O soro de leite é reconhecido pela sua qualidade nutricional e funcional, já que contém proteínas, lactose, minerais e vitaminas. A presença de proteínas no soro torna-o um produto adequado para emprego na alimentação humana devido a elevada qualidade nutricional destas proteínas. Uma das recentes utilizações das proteínas do soro de leite têm sido no desenvolvimento de embalagens comestíveis e/ou biodegradáveis.

Os filmes podem ser utilizados como agentes de suporte para diversos tipos de aditivos como, por exemplo, a incorporação de agentes antimicrobianos, com o objetivo de criar no interior da embalagem um ambiente que vai atrasar ou impedir o crescimento de microrganismos na superfície do produto, prolongando seu tempo de vida de prateleira. Outros aditivos, tais como antioxidantes, agentes anti-escurecimento, nutracêuticos, intensificadores de sabor, textura e cor, também podem ser adicionados para melhorar as propriedades funcionais dos filmes e/ou dos alimentos embalados.

São diversos os requisitos relativos ao material de embalagem dos alimentos em termos de barreiras: contra a luz, umidade, vapor de água e gases. Estes são específicos para o tipo de alimento a ser embalado, de forma a garantir um produto de qualidade ao longo da sua vida útil. Os filmes proteicos à base de soro de leite podem ser utilizados como um complemento à embalagem sintética, prolongando a vida de prateleira garantindo maior qualidade do produto final, além de apresentar um potencial econômico, pois sua matéria-prima é de baixo custo e biodegradável. Filmes obtidos a partir das proteínas do soro de leite caracterizam-se pela transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para consumo.

Diante do exposto, o objetivo geral desta pesquisa é o desenvolvimento de filmes à base de soro de leite desmineralizado para aplicação em alimentos. A partir deste objetivo geral, os objetivos específicos desta pesquisa são listados a seguir:

- caracterizar as matérias-primas utilizadas neste estudo quanto às propriedades físico-químicas;

-
- definir proporções de soro de leite desmineralizado ou proteína isolada ou proteína concentrada, de glicerol e aditivos (quitosana, nanoquitosana e óleo de semente de uva) utilizados na preparação dos filmes;
 - obter e caracterizar os filmes à base de soro de leite pela técnica de *casting*;
 - avaliar a biodegradabilidade dos filmes preparados;
 - avaliar o comportamento dos filmes em ensaio de envelhecimento acelerado;
 - investigar o comportamento dos filmes durante longo período de estocagem;
 - analisar o desempenho dos filmes na aplicação direta e indireta em produto lácteo (queijo minas frescal).

Capítulo 2

Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica

O presente capítulo tem por premissa básica expor particularidades relacionadas a embalagens de alimentos. Também são evidenciados fundamentos teóricos que tangem as embalagens à base das proteínas do soro de leite, a origem e a importância do soro de leite e de suas proteínas.

2.1 Princípios da Embalagem de Alimentos

A embalagem é parte essencial do processo de transformação e de distribuição dos alimentos. Ela deve proteger o alimento contra uma variedade de impactos, abrangendo danos físicos, químicos e contaminação por vetores biológicos, incluindo microrganismos, insetos e roedores. Fatores ambientais, como a permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água também devem ser observados, uma vez que podem degradar o alimento. Os fundamentos teóricos relacionados aos princípios da embalagem de alimentos estão baseados nos trabalhos de Fellows (2006), Melrose e colaboradores, (2015) e Selke (1997).

2.1.1 Funções da embalagem

A principal função da embalagem para os alimentos é envolvê-los e mantê-los seguros até serem consumidos, desta forma protegendo-os contra riscos mecânicos e ambientais encontrados durante a sua distribuição e utilização. Além disso, pode ser utilizada como identificação do conteúdo, servindo de auxílio para sua distribuição e venda. O *design* da embalagem deve atender às exigências legais com relação à rotulagem dos alimentos.

2.1.2 Requisitos para embalagem de alimentos

Alguns dos requisitos gerais mais importantes para embalagens de produtos alimentares são: atoxicidade, proteção contra contaminação de microrganismos, atuação como barreira à perda ou ao ganho de umidade e à entrada de oxigênio, proteção contra a penetração de odores ou agentes tóxicos ambientais, bloqueio da luz UV, entre outros. Além disso, as embalagens devem proporcionar resistência a danos físicos, transparência, resistência à adulteração, facilidade de abertura, fácil manejo dos resíduos, compatibilidade de tamanho, forma e

requisitos de peso, apresentar baixo custo e ter compatibilidade com o alimento (JONES; MANDAL; SHARMA, 2015).

A razão para a presença de alguns requisitos especiais para embalagens que estão em contato direto com o alimento é a segurança. Uma vez em contato, os componentes do material da embalagem podem migrar para o alimento.

2.1.3 Propriedades da embalagem

A vida útil de um produto é, muitas vezes, determinada pela capacidade da embalagem evitar a perda de componentes desejáveis do produto e prevenir a entrada de substâncias que afetam adversamente sua qualidade. Essas perdas ou ganhos são dependentes do ambiente circundante ou da própria embalagem. Geralmente, há perda ou ganho de substâncias voláteis. Nesta seção são apresentadas as principais características das embalagens e algumas pesquisas sobre como a formulação pode influenciar essas características, com enfoque no uso de soro de leite e de suas proteínas.

2.1.3.1 Permeabilidade

As propriedades de barreira de um filme se referem a sua capacidade para retardar a transferência de gases, umidade, odores e luz através da embalagem. O processo de transferência ocorre quando o material permeante passa através da embalagem, do lado de maior concentração para o de menor concentração. O processo de permeação ocorre em várias etapas. Em primeiro lugar, a molécula permeante pode se sorver no polímero, em seguida, difunde-se através dele, e, finalmente, é desorvida a partir do polímero, no outro lado da embalagem. Na verdade, a transferência ocorre em ambas direções, mas o efeito líquido é a transferência do lado de maior concentração para o lado de menor concentração. A rapidez deste processo é função tanto da dissolução do permeante no polímero (a sua constante de solubilidade), quanto da rapidez com que as moléculas do permeante se deslocam dentro da matriz do polímero (a sua difusividade).

A permeabilidade, isto é, a facilidade com que o permeante pode fluir através de poros, é proporcional ao tamanho do poro ao quadrado. Também depende de outros parâmetros importantes, tais como: espessura, tempo, diferença de pressão de vapor entre duas superfícies específicas, sob condições de temperatura definidas. O processo de formação de um filme pode alterar as características do material, como resultado da história de calor e alterações associadas à cristalinidade, alterações no grau de orientação, a introdução de macrovazios, levando, por exemplo, ao aumento da permeação entre outros fatores.

De Andrade e colaboradores (2017) desenvolveram filmes multicamadas compostos por soro de leite, gelatina e polihidroxialcanoatos (PHAs). A análise da permeabilidade ao vapor de água mostrou que os filmes multicamadas apresentaram valores mais baixos em relação ao filme contendo apenas PHA (controle). Isto ocorreu porque a incorporação da gelatina e soro de leite eliminaram possíveis microporos na matriz polimérica, formando uma matriz mais coesa, o que aumentou a barreira à água e diminuiu o valor da permeabilidade ao vapor de água. No entanto, a difusão depende do tamanho, forma e polaridade das moléculas penetrantes, bem como do movimento segmentado da cadeia polimérica na matriz do filme. Ao adicionar um componente hidrofóbico à suspensão de formação do filme, são produzidas películas compostas, uma vez que foi observada a formação de uma película heterogênea, nas quais o componente lipídico atua como uma barreira ao vapor de água e a proteína ou polissacarídeo fornece a barreira de oxigênio e as características mecânicas necessárias para uma boa película.

Weizman e colaboradores (2016) obtiveram vários revestimentos de proteína isolada de soro de leite (WPI), adicionando poli(álcool vinílico) e pectina para melhorar as propriedades da película revestida. Além disso, nanopartículas de argila foram utilizadas para melhorar as propriedades de barreira de vapor de água. A comparação do filme puro de poli(álcool vinílico), (PVA), com o poli(ácido láctico) (PLA) revestido com WPI apresentou melhoria de cerca de 90 % nas propriedades de barreira ao oxigênio, e cerca de 27 % nas propriedades de barreira ao vapor de água. A redução da barreira ao oxigênio pode ser devido à alta cristalinidade do revestimento de WPI e alta quantidade de ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias moleculares de WPI após desnaturação por calor. Por outro lado, o filme revestido com WPI exibiu propriedades de barreira de vapor de água relativamente pequenas em comparação com os dados reportados na literatura, com um aumento no valor da permeabilidade ao vapor de água em comparação com o filme não revestido, provavelmente devido à natureza hidrofílica do revestimento proteico. Além disso, o revestimento de WPI modificado com nanopartículas de argila ou pectina melhorou as propriedades de barreira ao vapor de água da película revestida com WPI não modificada em quase 50 %, e as propriedades de barreira de vapor de água do filme PLA não revestido em 27 %. A partir desse estudo, os autores concluíram que existe uma correlação entre a permeabilidade ao vapor de água e a rugosidade superficial dos filmes revestidos com WPI: à medida que a rugosidade da superfície aumentou a permeabilidade ao vapor de água aumentou também.

2.1.3.2 Migração

A migração refere-se à transferência de materiais, a partir da embalagem para o seu conteúdo ou de um ou mais componentes do produto para a embalagem. Entre as substâncias que podem migrar da embalagem para o produto estão incluídos monômeros residuais, catalisadores, solventes, antioxidantes e outros aditivos do polímero. Podem ser motivo de preocupação por razões de saúde ou podem estar relacionados com ausência de sabor ou ativação de odores no produto. Às vezes, a migração é desejável, por exemplo, quando um antioxidante migra de um filme fornece proteção contra a oxidação no produto. Mas frequentemente, a migração não é desejável. Mesmo quantidades extremamente pequenas de alguns compostos podem produzir alterações de sabor e de odor perceptíveis em determinados produtos. A migração é muito semelhante à permeação em que a Lei de Fick é, geralmente, governante. Neste caso, no entanto, a quantidade de migrante é fixa, de modo que a concentração na fase polimérica diminui com o tempo. Além disso, dependendo da situação, a migração pode ocorrer apenas da embalagem para o produto ou pode ocorrer tanto para o produto quanto para o ambiente externo. E também, dependendo do produto, a difusão no interior do mesmo pode ou não desempenhar um papel importante. A migração de um ou mais componentes do produto para a embalagem refere-se ao sabor, aroma ou componentes de cor, e a perda é geralmente prejudicial para o produto.

Embalagens ativas e inteligentes

As embalagens ativas são aquelas que mudam as condições do ambiente que cerca o alimento a fim de prolongar a sua vida útil e manter as propriedades sensoriais e de segurança, a medida que, as embalagens inteligentes constituem um sistema que monitora as condições do alimento, fornecendo informações sobre sua qualidade durante o transporte, armazenamento ou comercialização. Uma forma de migração dos componentes da embalagem para alimento é a utilização de embalagens ativas e inteligentes. A embalagem de liberação controlada é uma tecnologia emergente pela qual os compostos ativos, como antimicrobianos e antioxidantes, são liberados dos materiais de embalagem para a superfície do alimento a taxas desejáveis para fornecer reabastecimento contínuo de compostos ativos, inibir o crescimento bacteriano e prolongar a vida útil do produto (MASTROMATTEO e colaboradores, 2010). Essa tecnologia supera as limitações das abordagens tradicionais, nas quais os compostos ativos são adicionados diretamente à formulação de alimentos, resultando em perda de atividade rápida e sobrecarga

de compostos ativos devido à falta de segmentação superficial. Conseqüentemente, um maior nível de proteção alimentar é alcançado com embalagens de liberação controlada usando quantidades menores de agentes ativos em comparação com as quantidades usadas nas abordagens tradicionais (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; MIN; KROCHTA, 2005).

Ozer e colaboradores (2016) desenvolveram um sistema de liberação controlada com base em complexos de ácido poliacrílico/lisozima, adaptados ao pH, incorporado dentro de uma matriz de filme hidrofílico de WPI para aplicações em embalagens ativas de alimentos. Em geral, os resultados sugeriram que a complexação da lisozima com polieletrólitos fracos pode ser usada como uma estratégia efetiva para alcançar um efeito antimicrobiano duradouro e que os filmes preparados com tais complexos possuem grande potencial como materiais de embalagem de alimentos.

Especificamente, a embalagem ativa antioxidante procura prevenir ou retardar a oxidação de certos componentes alimentares, como lipídios e proteínas, o que leva à deterioração das características físicas (como sabor e cor) desses produtos alimentares. Essa abordagem de material ativo requer a incorporação intencional de antioxidantes nos materiais de embalagem e sua migração para esses alimentos (ROBERTSON, 2012). Fabra, López-Rubio e Lagaron (2016) utilizaram o processo eletro-hidrodinâmico para encapsular um antioxidante, α -tocoferol, utilizando diferentes matrizes de hidrocoloides (WPI e zeína e proteína de soja isolada) como materiais encapsulantes.

2.1.3.3 Transmissão de luz

A transmissão de luz é necessária em embalagens, cujo objetivo é mostrar o conteúdo ao consumidor, mas deve ser controlada quando os alimentos são suscetíveis à deterioração pela luz (por exemplo, oxidação lipídica, destruição da riboflavina e de pigmentos naturais). A quantidade de luz absorvida ou transmitida varia com o material da embalagem e com o comprimento de onda da luz incidente. Além disso, a espessura e composição do material irão influenciar diretamente a transmissão de luz. Alguns materiais (por exemplo, polietileno de baixa densidade) transmitem tanto a luz visível quanto a ultravioleta em intensidade semelhante, enquanto outros (por exemplo, poli(cloreto de vinilideno)) transmitem a luz visível, mas absorvem a luz ultravioleta. Os pigmentos podem ser incorporados em recipientes de vidro ou filmes de polímeros, que podem, também, ser cobertos com rótulos de papel para reduzir a transmissão da luz em produtos sensíveis. Alternativamente, as embalagens transparentes podem ser acondicionadas em caixas de papelão para distribuição e estocagem.

A transparência dos filmes à base de emulsões está relacionada à sua estrutura interna, que é afetada pela fração de volume de óleo e distribuição de tamanho de gotículas em emulsões formadoras de filme e seu rearranjo durante a secagem (VILLALOBOS et al., 2005). Para processos úmidos, um filme baseado em uma emulsão estável é formulado pela incorporação de material lipídico e surfactante em uma solução preparada para formação de filme biopolimérico. O componente lipídico é fundido elevando-se a temperatura da solução acima do ponto de fusão lipídico. Em seguida, é homogeneizado para dispersar e aprisionar partículas lipídicas na matriz proteica após a secagem (JANJARASSKUL; TANANUWONG, 2019). A evaporação do solvente durante a secagem induz mudanças na estrutura da emulsão por fenômenos de desestabilização, tais como *creaming*, agregação e/ou coalescência, que têm um papel importante nas propriedades ópticas dos filmes comestíveis à base de emulsão (ZÚÑIGA et al., 2012). Galus e Kadzinska (2016a) obtiveram filmes de emulsão de proteína de soro de leite e óleo de colza. Os filmes emulsificados obtidos eram muito mais opacos do que os filmes controle à base de soro. As gotículas dispersas na matriz da proteína de soro de leite afetaram a transparência, evitando a transmissão de luz através do filme (PEREDA; AMICA; MARCOVICH, 2012).

A presença de uma fase dispersa, não miscível, promove a opacidade em função das diferenças no índice de refração das fases e da concentração e tamanho de partícula da fase dispersa (MONEDERO et al., 2009; VILLALOBOS et al., 2005). Essa diferença de transparência também deve estar vinculada ao desenvolvimento da estrutura interna durante a secagem quando ocorrem muitas mudanças. Ao mesmo tempo, a viscosidade da fase contínua aumenta, levando a *creaming* e coalescência durante a evaporação do solvente (VARGAS et al., 2009). Cecchini e colaboradores (2017) obtiveram filmes à base de WPC com um componente lipídico, óleo de girassol ou cera de abelha, utilizando goma de Brea como emulsionante e também como componente da matriz. Um aumento na concentração de óleo de girassol resultou em uma diminuição significativa da transparência provavelmente devido a um maior tamanho de gotículas lipídicas na emulsão que obstruem a transmissão de luz.

Sukhija, Singh e Riar (2016) desenvolveram filmes biodegradáveis à base de diferentes concentrações de amido de rizoma de lótus (*Nelumbo nucifera*), acrescido de proteína concentrada de soro de leite (WPC) e casca de psyllium. A adição WPC na formulação do filme melhorou as suas propriedades de barreira na região UV e os valores de absorbância obtidos foram menores do que de embalagens sintéticas (polietileno de baixa densidade (LDPE) e polipropileno orientado (OPP)). A absorção ou a baixa transmitância da luz UV através dos

filmes de embalagem é importante durante o processamento de alimentos gordurosos para ampliar a vida útil, uma vez que esses alimentos são suscetíveis à degradação oxidativa catalisada por radiação UV (DICK et al., 2015; LÓPEZ; GARCÍA, 2012).

2.1.3.4 Resistência mecânica

A adequabilidade de uma embalagem para a proteção dos alimentos contra danos mecânicos depende de sua habilidade de resistir à compressão causada pelo empilhamento nos armazéns ou durante o seu transporte, à abrasão, causada pela fricção contra equipamentos ou durante o manuseio, à perfuração ou aos rompimentos causados pelos impactos durante o manuseio ou à vibração durante o transporte. Alguns alimentos são facilmente danificados e necessitam de um maior nível de proteção da embalagem. Para outros alimentos, a proteção é fornecida por um recipiente rígido e/ou com restrição à movimentação por filmes encolhíveis ou esticáveis ou pelo uso de embalagens plásticas que são moldadas junto ao produto.

A resistência à tração e o alongamento na ruptura podem ser correlacionados quantitativamente com a estrutura do polímero. Materiais com grande teor de ligações cruzadas, como os utilizados nas espumas rígidas, são fortes e duros, porém quebradiços, e os elastômeros e as espumas flexíveis têm alongamento na ruptura muito maior. A parte inicial em linha reta da curva de tensão \times deformação, onde o material exibe perfeita elasticidade, representa o desenovelamento e alinhamento das cadeias macromoleculares longas e flexíveis. Extensão posterior do polímero acarreta deslizamento das macromoléculas com o rompimento de ligações secundárias entre cadeias adjacentes, podendo resultar em deformações permanentes. Esses fatores são influenciados pela temperatura do material e pelo tempo em que a força é aplicada. Existem outros fatores que influenciam, como por exemplo, a compatibilidade entre os componentes da formulação. Na Figura 2.1 estão apresentadas algumas curvas típicas de tensão \times deformação de alguns materiais.

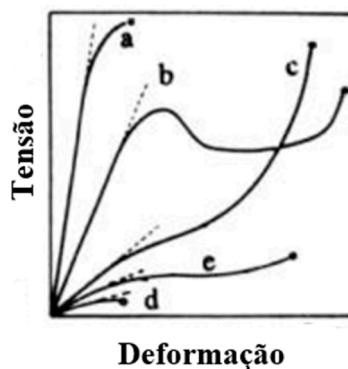


Figura 2.1 Curvas típicas de tensão \times deformação. (a) material duro quebradiço, (b) material duro e resistente, (c) material elástico, (d) material macio e fraco e (e) material macio e resistente. Fonte: adaptado de Chen (1995).

A força de tração é o esforço de tração máximo que um filme pode sustentar. O alongamento geralmente é tomado no ponto de ruptura e é expresso como a porcentagem de alteração do comprimento inicial da amostra. O módulo de elasticidade, ou o módulo de Young, representa a relação entre o estresse e a tensão sobre a faixa linear e mede a rigidez intrínseca do filme (CHEN, 1995).

Filmes à base de proteínas do leite são materiais viscoelásticos que possuem características de sólidos e líquidos. Uma matriz tridimensional, resultante das interações entre as moléculas das proteínas, é, possivelmente, a estrutura de suporte que dita as propriedades mecânicas dos filmes. As interações entre proteínas e pequenas moléculas, incluindo água, plastificantes, lipídeos e outros aditivos dispersos no espaço da matriz, também contribuem para o comportamento mecânico dos filmes.

Propriedades mecânicas adequadas para uma determinada aplicação garantem a integridade do filme e proteção contra defeitos menores, que podem prejudicar as funções do mesmo. A estabilidade do filme pode ser alterada quando o mesmo está sujeito a alterações de temperatura em torno de sua temperatura de transição vítrea (T_g).

Um exemplo de uma curva de teste de tração de um filme à base de proteína é mostrado na Figura 2.2 e um conjunto de testes de tração de diferentes filmes comestíveis é mostrado na Figura 2.3.

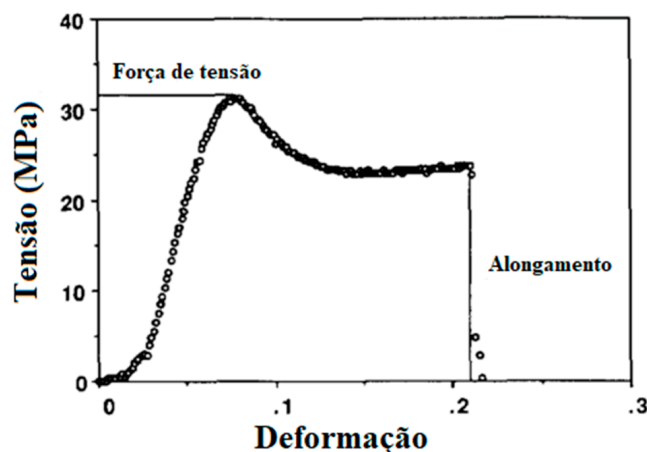


Figura 2.2 Curva tensão \times deformação de um filme à base de proteína. Fonte: adaptado de Chen (1995).

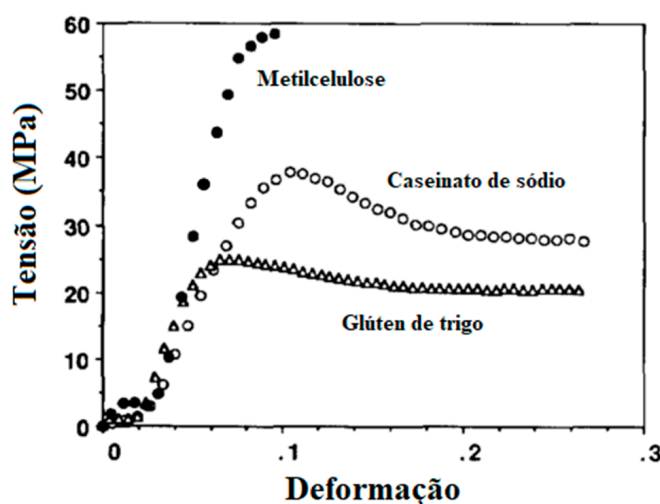


Figura 2.3 Curva tensão \times deformação de diferentes filmes comestíveis. Fonte: adaptado de Chen (1995).

A metilcelulose apresenta elevada força de tração e baixo alongamento, enquanto os filmes à base de proteína apresentam resistência à tração moderada e maior alongamento. O filme de metilcelulose é considerado duro e quebradiço e os filmes à base de proteína são macios e resistentes. Essas diferenças podem ser atribuídas a diferentes estruturas moleculares. A estrutura da matriz do polímero da metilcelulose é linear e das proteínas geralmente são de configuração aprimorada, devido às complexas interações inter- e intramoleculares e uma variedade de grupos de cadeia lateral. À medida que a carga aumenta, a força de tração dos filmes à base de proteínas aumenta.

As propriedades mecânicas de alguns filmes são mostradas na Tabela 2.1. Os filmes à base de proteínas geralmente são fortes e resistentes, apresentam boa resistência à tração e alongamento moderado. Alguns filmes de proteína têm uma resistência à tração semelhante à

dos filmes sintéticos, como a gelatina. As proteínas podem ser usadas como uma boa matriz estrutural de filmes compostos.

Tabela 2.1 Dados de alongamento na ruptura (ϵ_b), tensão na ruptura (σ_b) e espessura de diferentes filmes obtidos na literatura.

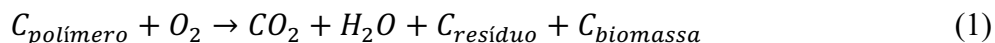
Tipo de filme	ϵ_b (%)	σ_b (MPa)	Espessura (mm)	Fonte
WPI	27,6	3,32	0,181 ± 0,028	(OZDEMIR; FLOROS, 2008a)
WPI	144,03 ± 2,72	3,17 ± 0,08	0,13 ± 0,01	(FERNANDES et al., 2020)
Gelatina	220	4,50 ± 0,58	0,149 ± 0,006	(KAEWPRACHU et al., 2016)
WPC	84	6,14 ± 0,15	0,174 ± 0,007	(KAEWPRACHU et al., 2016)
WPC	29,4 ± 10,2	10,8 ± 0,6	0,122 ± 0,017	(AGUDELO-CUARTAS et al., 2020)
PVC	254	44,9 ± 2,65	0,010 ± 0,001	(OSÉS et al., 2009)
WPI e amido de milho	4,4 ± 0,5	12,1 ± 1,3	0,130 ± 0,010	(OSÉS et al., 2009)
WPC	4,36 ± 0,83	3,32 ± 0,43	0,154	(SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011)
WPI e gelatina	12,55 ± 3,19	10,77 ± 2,31	0,052	(WANG; AUTY; KERRY, 2010)
Gelatina	52,00 ± 1,70	50,58 ± 1,12	0,071 ± 0,005	(XIAO et al., 2016)
PVC rígido	21,9 ± 1,3	50,71 ± 0,95	-	(BALZER et al., 2007)
Gelatina e nanopartículas de prata e cobre	40,6 ± 3,9	28,6 ± 1,7	0,089 ± 0,004	(ARFAT et al., 2017)
WPC e óleo de girasol	8,83 ± 3,12	0,73 ± 0,12	0,175 ± 0,019	(CECCHINI et al., 2017)
WPC e cera de abelha	7,55 ± 1,94	1,05 ± 0,48	0,170 ± 0,013	(CECCHINI et al., 2017)
Gelatina e agar	38,89 ± 2,40	13,62 ± 0,64	-	(MOHAJER; REZAEI; HOSSEINI, 2017)

PVC = policloreto de vinila, WPC = proteína concentrada de soro do leite, WPI = proteína isolada de soro do leite.

2.1.4 Degradação biológica natural

A biodegradação de um determinado material ocorre quando ele é usado como nutriente por um determinado conjunto de microrganismos (bactérias, fungos ou algas) que existe no meio ambiente, onde o material vai ser degradado. Para que essa colônia de microrganismos cresça usando o material como nutriente é necessário que eles produzam as enzimas adequadas

para quebrar algumas das ligações químicas da cadeia principal do polímero. Essa quebra das ligações químicas pode ocorrer na presença de oxigênio, biodegradação aeróbica (Equação 1), onde o polímero é convertido em dióxido de carbono, água, sais minerais e outros elementos presentes (mineralização) e nova biomassa, ou na ausência de oxigênio, biodegradação anaeróbica (Equação 2), onde o polímero é convertido em dióxido de carbono, metano, sais minerais e nova biomassa (ASHTER, 2016; PAOLI, 2008).



Além disso, é necessário ter as condições adequadas de temperatura, umidade, pH e disponibilidade de oxigênio (quando o processo for aeróbico). A velocidade de crescimento da colônia de microrganismos vai determinar a velocidade com a qual o material está sendo biodegradado. Naturalmente, que a escala de tempo na qual ocorre a biodegradação é uma das variáveis mais importantes a serem consideradas. De modo geral, a escala de tempo adequada é da ordem de semanas ou meses (PAOLI, 2008).

Tipicamente, o teste de biodegradabilidade é feito observando-se o crescimento da colônia de microrganismos em um meio de agar-agar. O meio contém todos os nutrientes necessários para a reprodução do microrganismo, exceto uma fonte de carbono (que deverá ser o polímero). O teste dura 3 semanas e os materiais são classificados em função da área coberta pelo crescimento da colônia. Outro método de teste é o enterramento de corpos de prova no solo usando polímeros marcados com ^{14}C e medindo a evolução de $^{14}CO_2$ em função do tempo. A composição do solo e as condições do teste são definidos pela norma ASTM G-160-03. Outra forma de acompanhar esse teste é medindo a variação de uma ou mais propriedades dos corpos de prova em função do tempo de exposição. Por exemplo, pode-se acompanhar a variação de massa, as propriedades mecânicas, o índice de fluidez ou a massa molar. O tipo e formato dos corpos de prova são definidos pelas medidas que serão usadas para o acompanhamento do ensaio (PAOLI, 2008).

Buscando avaliar a degradação biológica dos polímeros, diferentes ensaios podem ser realizados, entre eles (MOORE; SAUNDERS, 1997):

- a) ensaio visual, onde as colônias microbianas podem ser vistas a olho nu;
- b) ensaio de propriedades mecânicas, o qual é possível acompanhar mudanças na resistência à tração, deformação, etc.;

- c) teste da lâmina, onde a degradação biológica é visualmente avaliada pela colonização da superfície de medida e também pela perda de matéria seca, sendo estas medidas imprecisas;
- d) ensaio anaeróbico, o qual através de um respirômetro é possível medir a produção de gás, dióxido de carbono ou metano, a partir de um ambiente anaeróbico;
- e) ensaio de solo, no qual são utilizados dois tipos de solo com alta e baixa carga orgânica, durante um período de tempo;
- f) teste de simulação, onde é simulado em laboratório o ambiente natural no qual o polímero será depositado.

2.1.5 Envelhecimento acelerado

O ensaio de envelhecimento acelerado é utilizado quando é preciso se obter uma resposta rápida com relação a um tipo específico de formulação ou comparando um tipo de aditivação com outro, uma vez que esse ensaio fornece uma resposta na escala de tempo de meses. Nesses ensaios, os fatores que causam a degradação podem ser simulados isoladamente ou em conjunto, de forma controlada. Por exemplo, somente irradiação com luz UV em temperaturas moderadas, variação de temperatura e irradiação UV ou irradiação UV e névoa salina. Essas condições também podem ser aplicadas de maneira cíclica nos equipamentos modernos que são controlados por computadores. Como fonte de luz nesses equipamentos usa-se normalmente uma lâmpada de arco de xenônio que, convenientemente filtrada, dá a melhor simulação do espectro visível e UV da luz solar. Neste caso, o envelhecimento das amostras é acompanhado por observação visual ou medidas físicas executadas a intervalos regulares de tempo, tais como ensaios mecânicos, espectro de infravermelho, gravimetria, etc. A escolha do método de acompanhamento é fortemente dependente do modo de degradação de um polímero específico e da propriedade de interesse (PAOLI, 2008).

2.1.6 Considerações ambientais

O Brasil produziu aproximadamente 79 milhões de toneladas de resíduos sólidos urbanos em 2018. Desse montante, 92 % (72,7 milhões) foi coletado. Para o Rio Grande do Sul, a geração foi de 4.573 t/ano, correspondendo a uma geração per capita de 0,404 kg/habitante/ano (ABRELPE, 2020). Segundo estudo realizado pelo IBRE (Instituto Brasileiro de Economia) e FGV (Fundação Getúlio Vargas), os plásticos representam a maior participação no valor da produção de embalagens, correspondente a 41 % do total, seguido pelo setor de embalagens de papel/cartão/papelão com 30 %, metálicas com 19 %, vidro com 6 %, e outros com 4 %.

têxteis para embalagens com 3 % e madeira com 1 %. Dentre os grandes usuários de embalagens, alimentos, bebidas e eletrodomésticos apresentaram crescimento. Já os outros setores, como farmacêuticos e cosméticos, por exemplo, tiveram uma retração em sua produção (ABRE, 2020).

A escassez notável em recursos fósseis tem acelerado a busca por melhores conceitos para embalagens plásticas. O desenvolvimento de novas soluções, os bioplásticos ou embalagens biodegradáveis, estão se expandindo consideravelmente. Essas embalagens atendem as exigências sociais e ambientais. Elas utilizam os recursos de forma tão eficiente quanto é possível atualmente, mantendo alimentos seguros, suportando o calor elevado, a diminuição da geração de CO₂ e oferecendo novas opções de recuperação.

Em suma, oferecem qualidades semelhantes à de uma embalagem convencional e têm como principais vantagens a utilização de recursos renováveis e, por consequência, a proposição de valor intrínseco de reduzir o impacto ambiental das embalagens.

A preocupação com a poluição ambiental causada por materiais de embalagem deu origem à pesquisa de filmes comestíveis ou biodegradáveis para a embalagem de alimentos em geral e filmes que podem ser usados para embalar frutas frescas e controlar a taxa de respiração. Exemplos de materiais comestíveis incluem as proteínas de soja, as proteínas de amendoim, as proteínas de semente de algodão, a caseína, proteínas do soro de leite, alginatos e colágeno. Os envoltórios de colágeno para produtos cárneos foram um dos primeiros filmes desenvolvidos.

Entretanto, a maioria dos polímeros naturais possui propriedades mecânicas inferiores às dos materiais sintéticos e isso, associado aos problemas de processamento, estão restringindo seu amplo uso. O desempenho pode ser melhorado através da combinação de diferentes materiais e incorporação de aditivos. Há uma vasta gama de materiais provenientes de fontes renováveis, biodegradáveis e até mesmo comestíveis utilizados para a produção de filmes, mas o foco desta pesquisa é a utilização de soro de leite para produção de embalagens.

2.2 Embalagens Comestíveis e Biodegradáveis

Atualmente, estudos sobre filmes biodegradáveis e comestíveis têm sido intensificados, uma vez que a aplicação de filmes em determinados produtos promove benefícios ambientais, sociais e econômicos. Em certas circunstâncias, eles podem substituir polímeros sintéticos, ser utilizados em embalagens multicamadas e proporcionar oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos (DE ANDRADE et al., 2017; FALC; RANDAZZO; GLORIA, 2018; KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014; NAWAB et al., 2018; THAKUR et al., 2018). Esses filmes são obtidos a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou combinações desses

componentes (HASSAN et al., 2018). Entre eles, materiais à base de proteínas parecem ser mais atraentes (CAO; FU; HE, 2007; GALUS; KADZIŃSKA, 2016b; SILVA et al., 2018), pois podem melhorar as propriedades organolépticas dos produtos alimentares embalados, complementar o valor nutricional e servir como transportadores para agentes antimicrobianos e antioxidantes. Além disso, podem regular a umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídeos e a migração de compostos de aroma e sabor entre os componentes dos produtos alimentares e da embalagem, e entre o alimento e o ambiente externo (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2009). O interesse nesses materiais em aplicações de embalagens de alimentos também tem aumentado devido a grandes excedentes dos processos industriais, pois, muitas vezes, são subprodutos desses processos.

Os componentes de filmes comestíveis e biodegradáveis podem ser divididos em três categorias: hidrocoloides, lipídeos e compósitos (FABRA; TALENS; CHIRALT, 2008). Hidrocoloides incluem proteínas e polissacarídeos, tais como amido, proteínas do soro de leite, gelatina, derivados de celulose, quitosana, entre outros. Os lipídeos incluem ceras, óleos e ácidos graxos. Os compósitos contêm tanto hidrocoloides quanto componentes lipídicos (KHANZADI et al., 2015). A escolha de materiais para um filme é, em grande parte, dependente das funções desejadas para a embalagem (KOKOSZKA et al., 2010a, 2010b). Logo, as propriedades dos filmes dependem do tipo de material utilizado e das condições do processo empregadas, que por sua vez determinam suas aplicações (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). No presente estudo foram avaliados filmes à base de soro de leite e gelatina; portanto, esses dois componentes serão discutidos com mais detalhes a seguir.

2.2.1 Embalagens à base de soro do leite

A aplicação de proteínas de soro de leite para a produção de filmes tem recebido grande atenção nos últimos anos (GALUS; KADZIŃSKA, 2016b). Isso é decorrente de suas propriedades de formação de películas comestíveis e/ou biodegradáveis, por apresentarem boa resistência mecânica, serem excelentes barreiras ao oxigênio, lipídeos e aromas, além do soro ser considerado um subproduto ou resíduo da indústria de queijo (ANDRADE et al., 2018; AZEVEDO et al., 2015; FENG et al., 2018; KOKOSZKA et al., 2010b, 2010a; WEIZMAN et al., 2016).

O soro do leite representa cerca de 90 % do volume de leite e em média, são utilizados 10 litros de leite de vaca para a produção de um quilograma de queijo, gerando, aproximadamente, 9 litros de soro (BYLUND, 1995). Além de aplicações de proteção de alimentos, outras aplicações têm sido propostas para o uso do soro de leite em embalagens tais

como o reforço das características sensoriais, controle da liberação de ingredientes ativos e controle da transferência de massa entre os componentes de alimentos heterogêneos (JANJARASSKUL et al., 2014).

2.2.1.1 Características do soro de leite

Os fundamentos teóricos relacionados ao soro de leite estão baseados em: Bylund (1995), Damodaran, Parkin e Fennema (2008), Fox e Mcsweeney (1998), Kosikowski e Mistry (1991) e Muehlhoff, Bennett e McMahon (2013).

Soro de leite é o líquido remanescente após a fabricação do queijo, é um líquido opaco, amarelo-esverdeado e que contém cerca de 55 % dos sólidos existentes no leite integral original, incluindo proteínas de soro de leite (20 % das proteínas totais) e a maior parte da lactose, minerais e vitaminas solúveis em água. Possui uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 30.000 e 60.000 mg de O₂ L⁻¹ e, em média, cada tonelada de soro não tratado descartado por dia equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (ATRA et al., 2005; DE ANDRADE; MARTINS; ANDRADE, 2002).

Atualmente, o queijo é uma das iguarias mais consumidas pelos brasileiros, seja ele o queijo industrial ou queijo artesanal. No Brasil, o consumo médio per capita de queijos é de 5,4 kg ano⁻¹. Pelas estimativas da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2017), o consumo per capita de queijos no Brasil deverá alcançar 11 quilos, em média, em 2030, depois de ter avançado aproximadamente 90 % entre 2005 e 2015. Considerando o consumo total, o avanço foi de 8 % a 9 % ao ano, em média, nos últimos anos. Em 2015, alcançou 1,105 milhão de toneladas. O número se refere aos queijos produzidos por empresas com Serviço de Inspeção Federal (SIF).

O volume de soro de leite gerado com a produção de queijo depende do tipo do laticínio, e a produção anual é de mais de nove bilhões de litros deste subproduto no Brasil. Anualmente, estima-se que metade desse montante é descartada no meio ambiente, o que representa mais de quatro bilhões de litros. Mesmo com essa grande produção de soro de leite, atualmente o Brasil é um dos maiores importadores mundiais do produto em pó, alcançando mais de 20 milhões toneladas/ano para atender o mercado interno, segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2017). A preocupação com a sustentabilidade ambiental, aliada à elevada importação de soro em pó, demonstram que o Brasil apresenta um potencial evidente para a utilização deste subproduto.

2.2.1.2 Composição química

O soro de leite em pó possui geralmente uma granulometria fina e caráter higroscópico. Sua cor é influenciada pela intensidade do aquecimento da etapa de desidratação. A seguir será apresentada uma breve explicação das características dos principais componentes do soro do leite.

Proteínas

As proteínas do leite são facilmente divididas entre caseínas e proteínas do soro de leite. A caseína compreende 80 % das proteínas do leite e durante a fabricação do queijo, aglomera-se em micelas formando o coalho, enquanto as outras proteínas passam para o soro do queijo. Além da β -lactoglobulina e da α -lactoalbumina, derivadas das glândulas mamárias e que perfazem 70-80 % das proteínas totais do soro do leite, há também a presença de albumina de soro bovina (BSA) e imunoglobulinas que são derivadas do sangue. Além dessas são encontradas as proteose-peptonas, lactoferrina e enzimas. Na Tabela 2.2 está apresentada a composição média das proteínas do soro do leite.

Tabela 2.2 Distribuição percentual média das proteínas do leite no soro (20 %)

Proteína	Concentração (g L ⁻¹)	Percentual aproximado do total de proteínas
β -lactoglobulina	2-4	9
α -lactoalbumina	1-1,5	4
Proteose-peptonas	0,6-1,8	4
BSA	0,1-0,4	1
Imunoglobulinas	0,6-1,0	2

Fonte: adaptado de Damodaran, Parkin e Fennema (2008).

As características das principais proteínas do soro de leite, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e BSA, são detalhadas a seguir.

- β -lactoglobulina: primeira proteína do leite a ser cristalizada e a designação β é derivada do fato de aparecer como segunda banda no perfil de ultracentrifugação do soro de leite. Apresenta polimorfismo genético (variantes A e B). Contém 162 resíduos de aminoácidos e massa molar ao redor de 18 kDa (A, 18,362 kDa e B, 18,276 kDa). Em pHs 5,1 e 6,7 se apresenta como um dímero estável, consistindo de duas unidades esféricas. Em pHs menores que 3,0 ou maiores que 8,0, os dímeros se dissociam em monômeros. Na faixa de pHs 5,1 e 3,8 (abaixo do ponto isoelétrico = 5,34) tende a formar octômeros, a baixas temperaturas e elevadas concentrações de proteína. O fenômeno de octomerização é atribuído à ionização de grupos carboxílicos nos pontos de interação. Sofre desnaturação térmica pelo aquecimento a

temperaturas superiores a 60 °C, como as demais proteínas do soro do leite. A 90 °C verifica-se completa desnaturação, sofrendo extensa transformação conformacional com exposição de grupos nucleofílicos (-SH: ϵ -NH₃⁺) altamente reativos e de áreas hidrofóbicas.

- α -lactoalbumina: a designação α deriva do fato de ser a primeira banda do perfil de ultracentrifugação. Sua principal característica é a tendência de formar associações em pHs abaixo do seu ponto isoelétrico (pH = 4,8). No pH natural do leite, pH 6,6, e acima, aparece como monômero. Desempenha papel importante como proteína modificadora da síntese de lactose pelas glândulas mamárias. É também uma proteína hipoalergênica. Duas variantes genéticas (A e B) já foram identificadas, mas somente a variante B tem sido observada em leites de raças bovinas ocidentais. A variante B contém 123 resíduos de aminoácidos com massa molar de 14,176 kDa.
- BSA: essa proteína tem sido isolada na forma cristalina a partir do soro de leite e parece ser idêntica à proteína encontrada no soro sanguíneo. Em pHs baixos ocorrem associações intermoleculares que são aparentes na eletroforese. A BSA passa para o leite através do sistema vascular.

Sais

Os sais do leite consistem principalmente de cloretos, fosfatos, citratos e bicarbonatos de sódio, de potássio, de cálcio e de magnésio. Assim, ambos sais orgânicos e inorgânicos estão presentes no leite. As espécies ultrafiltráveis, que estão em equilíbrio com as formas coloidais, podem ser obtidas no permeado por diálise ou ultrafiltração (UF). As espécies coloidais dos sais de leite se ligam às proteínas do leite. Essas interações afetam a estabilidade e funcionalidade das proteínas do leite. Assim, os sais de leite desempenham um papel importante nas propriedades de alimentos lácteos.

Carboidratos

A lactose é um dissacarídeo formado por galactose e glicose. A sua síntese está associada com a da α -lactalbumina, que atua como um modificador de proteínas. É caracterizada como um açúcar redutor. É o componente principal de produtos lácteos secos, leite em pó desnatado e soro de leite em pó, contendo cerca de 30 %, 50 % e 70 % de lactose, respectivamente. Por conseguinte, o comportamento da lactose tem um grande impacto sobre as propriedades dos produtos de leite em pó. Como um açúcar redutor, pode participar na reação de Maillard, levando ao escurecimento não enzimático, tendo um efeito negativo em produtos lácteos, pois acarreta coloração e sabores desagradáveis, ligeira perda do valor nutritivo (lisina)

e perda de solubilidade do pó. A lactose é o carboidrato predominante no leite bovino, responsável por 50 % dos sólidos do leite desnatado e pelo sabor característico do queijo. Desempenha um papel importante no setor de leite e dos produtos lácteos: é um constituinte essencial na produção de produtos lácteos fermentados, contribui para o valor nutritivo do leite e seus produtos e afeta a textura de determinados produtos concentrados e congelados. No entanto, muitas pessoas têm limitada ou nula capacidade de digerir lactose na fase adulta, levando a uma síndrome conhecida como intolerância à lactose, o que pode representar uma limitação no desenvolvimento de embalagens à base de soro de leite.

2.2.1.3 Produtos derivados do soro de leite

Na Figura 2.4 estão apresentadas algumas alternativas para o processamento do soro de leite. Apesar da crescente utilização do soro de leite na indústria alimentícia, em função das suas propriedades nutricionais e tecnológicas, esse produto ainda é considerado um resíduo da fabricação de queijo, principalmente em laticínios de pequeno e médio porte, sendo enviado às estações de tratamento de efluentes, descartado em cursos d'água ou destinado à alimentação animal.

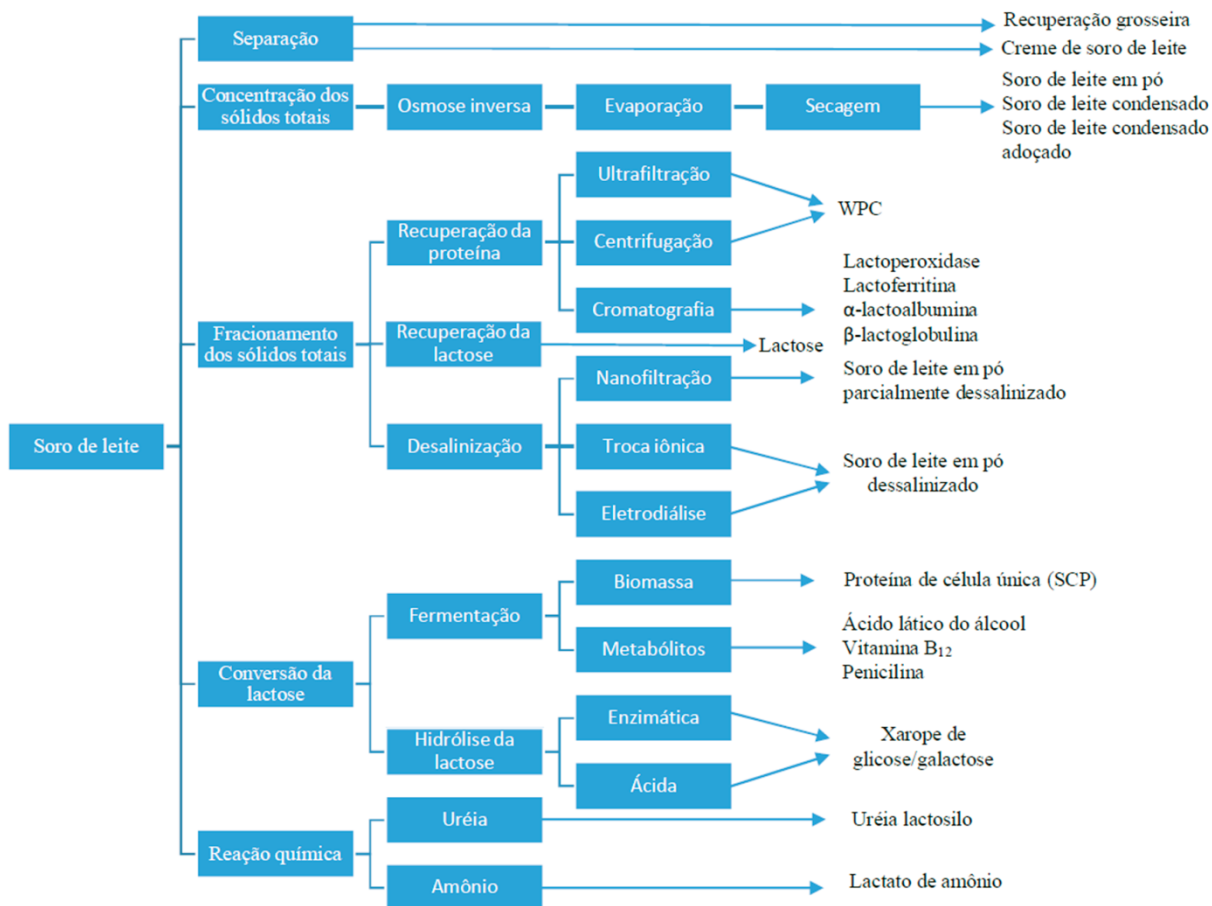


Figura 2.4 Alternativas para o processamento do soro de leite. Fonte: adaptado de Bylund (1995).

Concentrados de proteína de soro de leite (WPC) ou isolados (WPI) são muito utilizados como ingredientes com fins nutritivos, devido a sua elevada concentração de aminoácidos contendo enxofre, em comparação às proteínas vegetais, tais como as de soja. No passado, esses produtos tinham sua funcionalidade limitada por causa da grande desnaturação das proteínas ou devido à presença de reagentes de precipitação. A adoção comercial da tecnologia de membranas, incluindo a ultrafiltração (UF) associada à diafiltração (DF) e à troca iônica, resultou no desenvolvimento de uma variedade de produtos com funcionalidades variadas e excelentes. Os principais fatores que determinam a funcionalidade de um produto são a quantidade de desnaturação da proteína, o teor de lactose e as quantidades de lipídeos e de minerais presentes. Geralmente, a desnaturação da proteína reduz a solubilidade e prejudica funções que exigem atividade superficial, como emulsificação e formação de espuma.

Além da grande importância na alimentação (elevada composição de aminoácidos essenciais e digestibilidade), as proteínas do leite encontram inúmeras aplicações industriais. Na indústria de alimentos são muito utilizadas na formulação de produtos pelas suas propriedades funcionais (espumantes, emulsificantes, geleificantes, formação de fibras de

proteínas). Um número de peptídeos antimicrobianos derivados da β -lactoglobulina e da α -lactoalbumina tem sido identificado. Eles parecem ser ativos somente contra bactérias Gram-positivas.

Entre os produtos obtidos do soro de leite, os mais utilizados para fabricação de embalagens são os concentrados de proteína de soro de leite (WPC), com teores de proteínas que variam em 35 e 80 % (m/m) em base seca, bem como isolados de proteínas de soro de leite (WPI), com teores de proteína acima de 90 % (m/m) (RAMOS et al., 2013). Além de seu conteúdo de proteínas distintas, eles diferem nos níveis de outros constituintes, tais como lipídeos, minerais e lactose. Essas diferenças podem influenciar marcadamente as ligações intermoleculares nos filmes e, conseqüentemente, influenciar a capacidade de barreira e as propriedades mecânicas e térmicas, como resultado de estruturas moleculares distintas (KHWALDIA et al., 2004).

2.2.2 Embalagens à base de gelatina

Como um tipo de proteína, a gelatina é uma fonte promissora para a elaboração de filmes comestíveis e biodegradáveis, uma vez que possui uma boa capacidade de formação de filmes (ABEDINIA et al., 2018; BIGI et al., 2002; DING et al., 2017; JONGJAREONRAK et al., 2006; KHODAEI; OLTROGGE; HAMIDI-ESFAHANI, 2020; LI et al., 2015; NOWZARI; SHÁBANPOUR; OJAGH, 2013; WANG et al., 2020) com alta disponibilidade, baixo custo, natureza biodegradável (FARRIS et al., 2011), com as vantagens de boa barreira contra o oxigênio (WANG et al., 2016), alta transparência e excelentes características de barreira aos vapores orgânicos e ao óleo (JONGJAREONRAK et al., 2006). Além disso, a gelatina é derivada de resíduos ou subprodutos de processos de fabricação de curtumes, produtos farmacêuticos e alimentos (ZHANG et al., 2016). Os filmes à base de gelatina não apenas atuam como barreiras ao oxigênio, dióxido de carbono e compostos voláteis, mas também servem como portadores de grande variedade de aditivos, como antimicrobianos, antioxidantes, agentes antifúngicos, corantes e outros nutrientes (AHMAD et al., 2012). As características dos filmes à base de gelatina variam com a fonte de gelatina, o tipo e teor do plastificante, método de processamento, entre outros (VANIN et al., 2005).

A gelatina é a única entre os hidrocoloides com propriedade termorreversível, apresentando um ponto de fusão próximo da temperatura corporal (aproximadamente 36 °C), o que é particularmente importante em aplicações alimentares e farmacêuticas (ACHET; HE, 1995). Para as películas de gelatina espalhadas abaixo da temperatura de gelificação, as estruturas triplas helicoidais são formadas e ficam bloqueadas no local à medida que a água se

evapora da amostra. Para os filmes espalhados acima da temperatura de gelificação, dependendo da temperatura do molde, menos estruturas helicoidais triplas são formadas e os filmes podem apresentar estrutura completamente amorfa, (CHIOU et al., 2008).

No entanto, as propriedades mecânicas, como a resistência do filme, são ainda inferiores às dos filmes sintéticos à base de petróleo (ARVANITOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1998; MARTUCCI; RUSECKAITE, 2010). Além disso, a fraca resistência à água e consequente fraca capacidade de barreira de vapor de água, com base em sua natureza hidrofílica, é uma propriedade que necessita ser melhorada para tornar os filmes mais adequados para sua utilização como embalagem de alimentos (CAO; YANG; FU, 2009; HOQUE et al., 2011; ZHANG et al., 2010).

2.2.2.1 Características da gelatina

A gelatina é produzida a partir de colágeno por hidrólise ácida ou alcalina e é uma mistura heterogênea de polipeptídios. A massa molar média de polipeptídios em uma amostra de gelatina depende do grau de hidrólise. Quanto maior a massa molar média, maior a resistência do gel. As amostras de gelatina com massa molar média < 20.000 Da não formam géis em toda a concentração de gelatina. As propriedades de gelificação dos produtos comerciais de gelatina são expressas em termos de avaliação da medida *bloom*, utilizando um texturômetro. A classificação do *bloom* é definida como a massa em gramas necessária para conduzir um êmbolo de um texturômetro de 4 cm em uma solução de gelatina de 6,67 % (m/v) que foi incubada durante 17 h em um banho de água a 10 °C (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008). Tanto a resistência ao gel como a termoestabilidade são, em grande parte, dependentes das propriedades moleculares da gelatina, especialmente em relação a dois fatores principais: (i) a composição de aminoácidos, específica da espécie, e (ii) a distribuição da massa molar, que resulta principalmente das condições de processamento (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2002).

Dependendo do procedimento de pré-tratamento utilizado para a obtenção de gelatina, são conhecidos comercialmente dois tipos de gelatina: gelatina de tipo A (ponto isoelétrico em pH próximo de 8-9) e gelatina tipo B (ponto isoelétrico em pH próximo de 4-5), obtidos a partir de pré-tratamento em condições ácidas e alcalinas, respectivamente (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A uma temperatura de cerca de 40 °C, as soluções aquosas de gelatina estão no estado sol e se transformam em géis quando são arrefecidas à temperatura ambiente, desde que a sua concentração seja suficientemente alta (PEZRON; DJABOUROV; LELBOND, 1991; ROSS-MURPHY, 1992), resultando em um aumento progressivo da resistência do gel (SARBON;

BADII; HOWELL, 2015). A transformação sol-gel é devida a uma transição do arranjo conformacional das cadeias de gelatina que formam redes termorreversíveis, associando hélices em zonas de junção estabilizadas por ligações de hidrogênio (BIGI et al., 2002; PANG et al., 2015). No entanto, a gelatina funde devido à dissociação de hélices triplas à medida que a temperatura é elevada acima de 35 ° C (SARBON; BADII; HOWELL, 2015).

As fontes mais abundantes de gelatina são a pele suína (46 %), pele bovina (29,4 %), carne suína e bovina (23,1 %), e outras fontes (1,5 %) (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A gelatina de peixe é uma alternativa promissora para a gelatina de mamíferos, pois pode ser produzida a partir de subprodutos de processamento de peixe e não tem preocupações com o consumidor em relação à encefalopatia espongiforme bovina ou às restrições dietéticas étnicas/religiosas (YANG et al., 2012).

2.2.2.2 Produtos derivados da gelatina

A gelatina é frequentemente utilizada em alimentos, produtos fotográficos, cosméticos e farmacêuticos, baseado principalmente nas suas propriedades formadoras de gel e viscoelásticas. Recentemente, e especialmente na indústria de alimentos, um número crescente de novas aplicações foi encontrado para a gelatina em produtos como emulsionantes, agentes espumantes, estabilizadores coloidais, agentes de compensação, materiais de embalagem biodegradáveis e agentes microencapsulantes, alinhado com a tendência crescente para substituir agentes sintéticos por naturais (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A gelatina é utilizada para estabilizar produtos lácteos como mousse, sorvete, iogurtes aromatizados e bebidas (SARBON; BADII; HOWELL, 2015). Os seus usos mais frequentes no campo biomédico incluem cápsulas duras e macias, microesferas, vedantes vasculares, curativos para feridas e almofada adsorvente para uso cirúrgico, bem como regeneração tecidual tridimensional (BIGI et al., 2002).

A gelatina foi relatada como um dos primeiros materiais utilizados como transportador de componentes bioativos. O enriquecimento de filmes de gelatina com antioxidantes naturais e/ou substâncias antimicrobianas pode ampliar as propriedades funcionais desses filmes biodegradáveis e fornecer um biomaterial de embalagem ativo. A aplicação de gelatina no desenvolvimento de microcápsulas fornece proteção contra oxidação ou degradação durante o armazenamento. Além disso, o encapsulamento pode ser usado para controlar a liberação de componentes funcionais para o organismo a partir do alimento ou da embalagem bioativa quando ingerida.

Colágeno e gelatina têm sido foco como fonte de pépticos biologicamente ativos com benefícios promissores para a saúde para aplicações nutricionais ou farmacêuticas. Geralmente, produtos de colágeno e gelatina e pépticos foram produzidos a partir de pele suína ou pele bovina (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

2.2.3 Embalagens à base de soro de leite e gelatina

Filmes à base de proteínas do soro do leite são caracterizados como uma película transparente, flexível, incolor e inodora (RAMOS et al., 2013). As proteínas do soro do leite apresentam boa capacidade de formação de película e seus filmes apresentam boas propriedades mecânicas e excelentes barreiras ao oxigênio, aromas e óleo em baixa umidade relativa (BERISTAIN-BAUZA et al., 2017; CHEN, 1995; GOUNGA; XU; WANG, 2010; HONG; KROCHTA, 2006; JANJARASSKUL et al., 2014; KHANZADI et al., 2015; KHWALDIA et al., 2004; KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014; MCHUGH; AUJARD; KROCHTA, 1994; MCHUGH; AVENABUSTILLOS; KROCHTA, 1993; MCHUGH; KROCHTA, 1994a; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000). No entanto, eles têm características indesejáveis, como a alta permeabilidade ao vapor de água (PVA) e baixa barreira à umidade, devido à sua natureza hidrofílica (BAHRAM et al., 2014; GALUS; KADZIŃSKA, 2016b; KADAM et al., 2013; KHANZADI et al., 2015; KHWALDIA et al., 2004; OYMACI; ALTINKAYA, 2016). Por outro lado, a gelatina pode formar filmes e revestimento com propriedades óticas e mecânicas adequadas e excelentes propriedades de barreira de gases em baixa umidade relativa, viscoelasticidade, excelente solubilidade a baixas temperaturas, transparência, inodoro e insípido (GÓMEZ-ESTACA et al., 2011; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; PEREDA et al., 2011; XIAO et al., 2016).

A fim de se obter filmes com melhores propriedades, películas compósitas foram desenvolvidas combinando as propriedades das proteínas do soro de leite e da gelatina para se obter um filme com as características desejadas (ARFAT et al., 2017; AZEVEDO et al., 2017; BASIAK; LENART; DEBEAUFORT, 2016; BIGUCCI et al., 2015; CHEN et al., 2019; CHENG; WANG; WENG, 2015; JOO et al., 2018; LIU et al., 2017b; MOHAJER; REZAEI; HOSSEINI, 2017; SHAMS; EBRAHIMI; KHODAIYAN, 2019; SILVA et al., 2018; TYUFTIN et al., 2020; WIHODO; MORARU, 2013), através da combinação da propriedade de cada um dos componentes (BIGUCCI et al., 2015; CHENG; WANG; WENG, 2015). Isto somente é possível se houver compatibilidade entre os componentes (SHAHBAZI et al., 2016).

As proteínas do soro têm caráter anfifílico, o que lhes permite interagir com diferentes moléculas (SILVA et al., 2016). Na maioria dos casos, a mistura de dois ou mais biopolímeros

resulta em separação de fases, que pode ser associativa (a primeira fase é enriquecida em ambos os polímeros e a segunda no solvente) ou segregativa (cada fase é enriquecida com um dos dois biopolímeros) (SARBON; BADI; HOWELL, 2015). A separação de fases segregativa foi observada em géis mistos binários proteína-proteína, tais como proteínas de leite e proteínas de soja (CHRONAKIS; KASAPIS, 1993), gelatina/soro de leite (WALKENSTRÖM; HERMANSSON, 1994) e soja/soro do leite (COMFORT; HOWELL, 2002).

As propriedades físicas dos filmes compósitos dependerão da natureza das matérias-primas e outros fatores de processamento, tais como concentração, proporção de mistura, pH, temperatura, entre outros (JIANG et al., 2010), e a escolha dos materiais é em grande parte dependente das funções pretendidas (KHANZADI et al., 2015). Por conseguinte, durante a preparação da solução filmogênica, deve-se selecionar concentrações adequadas para a formação da matriz (PAN et al., 2015).

Vários filmes compósitos baseados em gelatina foram desenvolvidos pela mistura de diferentes biopolímeros, como a quitosana (PEREDA et al., 2011), proteína de soro de leite (JIANG et al., 2010) e pectina (FARRIS et al., 2011). A mistura de gelatina com outros polímeros mostrou grande melhora nas propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água das películas (JIANG et al., 2010). Frente a isso, mais estudos envolvendo filmes compostos de soro e gelatina devem ser desenvolvidos.

2.3 Aditivção de filmes

Filmes à base de proteínas do soro de leite fabricados sem plastificantes são frágeis devido às várias interações de cadeia provocadas por uma grande quantidade de diferentes grupos funcionais e, por isso, não são adequados para a aplicação industrial. Essas interações de cadeia consistem de ligação dissulfureto, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas entre as cadeias de proteína e, tipicamente, conduzem à obtenção de filmes quebradiços (SCHMID, 2013). Com o intuito de superar esse problema, é necessária a incorporação de plastificantes para reduzir essa força, reduzindo as ligações de hidrogênio intermolecular que ocorre entre as cadeias poliméricas, aumentando a mobilidade do polímero e, assim, aumentando a flexibilidade do filme (JIMÉNEZ et al., 2012; MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011; OSÉS et al., 2009).

Os plastificantes são frequentemente adicionados para melhorar a flexibilidade, extensibilidade e dispersibilidade dos filmes (LIU et al., 2017a). Os mais comuns são os polióis (por exemplo, glicerol, sorbitol e polietilenoglicol), mono-, di- ou oligossacarídeos, lipídeos e seus derivados. As diferenças de composição, tamanho, forma e estrutura do plastificante

influenciam diretamente a sua função na estrutura da película (ORLIAC et al., 2003). Plastificantes hidrofílicos, tais como glicerol, polietilenoglicol e sorbitol são geralmente utilizados em filmes à base de proteínas.

A incorporação de agentes antimicrobianos em películas fornece um novo modo para melhorar a segurança e aumentar a vida de prateleira de produtos. O agente antimicrobiano atua para reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos nos alimentos embalados (VERMEIREN et al., 1999), podendo ser incorporado em revestimentos à base de polímeros (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002). Uma grande variedade de agentes antimicrobianos tem sido adicionada aos filmes e revestimentos para controlar o crescimento microbológico e prolongar o tempo de vida do produto, incluindo os ácidos orgânicos, enzimas, fungicidas e compostos naturais, tais como especiarias, óleos essenciais e quitosana (AKCAN; ESTÉVEZ; SERDAROGLU, 2017; ANDRADE et al., 2018; BERISTAIN-BAUZA et al., 2017; GHADETAJ; ALMASI; MEHRYAR, 2018; LIU et al., 2017b; MITRAKAS; KOUTSOUMANIS; LAZARIDES, 2008; SEYDIM; SARIKUS, 2006; THARANATHAN, 2003; VÁSCONEZ et al., 2009; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2010). A seguir serão detalhados os aditivos utilizados na fabricação dos filmes neste trabalho: glicerol, quitosana e óleo de semente de uva.

2.3.1 Glicerol

O glicerol é um dos plastificantes de qualidade alimentar mais utilizados para filmes de gelatina (VANIN et al., 2005). Pode reduzir as interações entre cadeias e assim modular as propriedades funcionais macroscópicas dos filmes para aplicações específicas (LUKASIK; LUDESCHER, 2006). A água também atua como plastificante para materiais hidrofílicos, cujas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira dependem fortemente do teor de água (KOKOSZKA et al., 2010b). De acordo com a literatura, o glicerol em uma proporção de 20-60% (calculado a partir da massa do agente formador de película), produz os melhores efeitos plastificantes em filmes à base de proteínas do soro de leite (MCHUGH; AUJARD; KROCHTA, 1994; MCHUGH; KROCHTA, 1994b; OSÉS et al., 2009; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005, 2000). Estudos anteriores sobre os efeitos do glicerol em filmes de gelatina mostraram que as propriedades (propriedades mecânicas, propriedades de barreira, entre outros) dos filmes dependiam do teor de glicerol (BANDEIRA et al., 2015; VANIN et al., 2005).

2.3.2 Quitosana

A quitosana é um polímero produzido industrialmente pela desacetilação química da quitina, encontrada em exoesqueletos de artrópodes. A quitosana é amplamente utilizada não somente devido à sua capacidade de formação de película, mas também devido as suas propriedades antimicrobianas (HELANDER et al., 2001; JUNG et al., 2010). Por esta razão, a quitosana tem sido utilizada como um revestimento ou película comestível, sendo empregada para estender a vida de prateleira de alimentos e inibir o crescimento microbiano (AIDER, 2010; GÓMEZ-ESTACA et al., 2007; LÓPEZ-CABALLERO et al., 2005). A atividade antibacteriana da quitosana se correlaciona intimamente com as características da superfície das células. Supõe-se ser derivado da carga positiva dos grupos amino presentes em pH ácido (inferior a 6,5), que levam à despolarização da membrana celular, bem como a ruptura da integridade da parede celular por ligações moleculares, causando a morte microbiana (KONG et al., 2010).

2.3.3 Óleo de semente de uva

Muitos lipídeos foram incorporados em filmes, a fim de aumentar as suas propriedades de barreira. Embora existam numerosos estudos sobre a modificação da estrutura da película de proteína de soro de leite por adição de ceras (JANJARASSKUL et al., 2014; SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011), óleos vegetais (JAVANMARD; GOLESTAN, 2008; SHAW et al., 2002) ou óleos essenciais (BAHRAM et al., 2014; SEYDIM; SARIKUS, 2006), não há informação disponível sobre a incorporação de óleo de semente de uva em filmes à base de proteína de soro de leite.

A semente de uva é um subproduto da fabricação de sucos e vinhos e contém entre 4 % e 17 % de óleo (FERNANDES et al., 2013; FIORI et al., 2014). O óleo de semente de uva (OSU) possui um alto teor de ácidos graxos essenciais, tais como o ácido linoleico (69-78 %), ácido palmítico (5-11 %), ácido oleico (15-20 %) e ácido esteárico (3-6 %), além de apresentar uma alta quantidade de compostos fenólicos, incluindo o ácido gálico, catequinas, epicatequinas e procianidinas. Apresenta também um elevado nível de antioxidantes, o que torna o óleo muito estável (BAIL et al., 2008; MAIER et al., 2009). Através do método de prensagem à frio, consegue-se uma extração do óleo com maior retenção dos componentes, uma vez que não envolve imposição de temperatura ou tratamento químico (PARRY et al., 2006). No Brasil, a região com maior ocorrência de cultivo de uva é na região sul do país, especialmente no Rio Grande do Sul (SHINAGAWA et al., 2015).

2.4 Comportamento dos filmes

Filmes à base de proteínas de soro de leite aplicados em alimentos podem mudar ao longo do tempo, causando perda de funções de proteção e afetando a aparência dos alimentos embalados (DANGARAN; KROCHTA, 2007). O efeito do armazenamento em algumas propriedades da película tem sido bastante explorado (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2015; KET-ON et al., 2016; PÉREZ et al., 2016; PHUPOKSAKUL et al., 2016; SCHMID et al., 2015).

Foi observado que as propriedades dos filmes à base de proteínas se alteram dentro dos primeiros dias, após a preparação da película. Em particular, uma diminuição da termoformabilidade de filmes poliméricos revestidos com formulações baseadas em proteína isolada do soro de leite. Enquanto laminados produzidos recentemente mostraram boas propriedades de termoformagem, não foi possível a obtenção de termoplástico sem rachaduras, após vários dias de armazenamento. Foi também observado uma diminuição da permeabilidade ao oxigênio (SCHMID, 2012). Como essas propriedades são afetadas pela microestrutura, plastificante, densidade, orientação do polímero e grau de reticulação (ANKER; STADING; HERMANSSON, 2000), foi assumido que essas alterações nas propriedades são causadas por certas alterações intrínsecas do material, que ocorrem durante o tempo de armazenamento, tais como pós-desnaturação das proteínas. Schmid e colaboradores (2015) exploraram a alteração das propriedades moleculares, durante o tempo de armazenamento de revestimentos à base de proteína isolada do soro de leite. Também foi determinada a duração até que a formação das interações moleculares pode ser considerada como concluída. Os valores de permeabilidade ao oxigênio mostraram uma correlação negativa entre o tempo de armazenamento e a permeabilidade, onde foi observado uma diminuição constante entre 2-3 semanas de armazenamento. As películas à base de WPI atingiram seu desempenho final após cerca de 2 semanas de armazenamento, devido à evolução das interações intermoleculares. Porém, as alterações seguiram após esse período de tempo.

A umidade do ambiente altera a T_g do filme. Se um filme perder gradualmente o seu teor de umidade para a atmosfera durante o armazenamento até o ponto em que a T_g do filme for superior à temperatura ambiente, a manutenção da integridade do filme é dificultada, devido a sua maior fragilidade (CHEN, 1995).

2.5 Aplicações dos filmes comestíveis

O uso de filmes e revestimentos comestíveis tem sido estudado como uma boa alternativa para a preservação de frutas e legumes frescos inteiros e minimamente processados, uma vez que tais filmes podem criar barreiras semipermeáveis para gases e vapor de água, mantendo a qualidade do produto. Esses filmes também têm sido estudados como potenciais portadores de aditivos para ajudar a preservar, ou até mesmo melhorar a qualidade dos produtos.

A utilização de filmes comestíveis como revestimento consiste em aplicar uma camada fina de material comestível à superfície do alimento, enquanto a utilização de filmes comestíveis como embalagem de alimento envolve a fundição de uma película de material comestível para cobrir a mercadoria. Em geral, a finalidade da utilização de películas comestíveis e revestimentos de frutas e legumes é retardar a transferência de gases, vapores e substâncias voláteis, proporcionando ao alimento uma atmosfera modificada que diminui a respiração e senescência, reduzindo assim a perda de aroma, retendo a umidade e diminuindo as alterações de cor durante o armazenamento.

Filmes e revestimentos comestíveis têm sido amplamente estudados durante os últimos 20 anos e muito tem sido publicado sobre a sua utilização para a conservação de frutas e vegetais frescos e minimamente processados. Na Tabela 2.3 estão apresentadas algumas aplicações de filmes à base de soro de leite para a preservação de frutas. Também foi relatado o uso de filmes à base de proteínas do soro de leite incorporados com cálcio e vitamina E (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015). Vale ressaltar que neste caso se deve advertir os consumidores quanto à presença de lactose, restringindo assim o uso deste tipo de revestimento.

Tabela 2.3. Aplicações de filmes à base de soro de leite para a preservação de frutas

Frutas	Revestimentos	Aditivos	Variáveis avaliadas	Resultados
Fatias de maçã	WPC + cera de abelha	AA, cisteína-cis e 4-hexilresorcinol	WL, C, BI, ST	Revestimentos WPC-AA e WPC-BW reduziu BI. WL não estava prevenida pela utilização de revestimento
Fatias de maçã	WPI ou WPC + cera de abelha ou carnaúba	Glicerol, ácido esteárico	WL, BI, C	WL não foi evitada. WPI e WPC foram mais eficientes na preservação de C em comparação com HMPC
Pedaços de caqui	WPC-cera de abelha ou WPC-cera de abelha + AA	Glicerol	WL, F, C	Revestimento WPC-BW-ascorbato reduziu B, WL e perda de F nos caquis frescos cortados
Fatias de maçã	WPI-cera de abelha	Glicerol, ácido esteárico	WL, C, ST	Menor BI que as maçãs sem revestimento. WL não foi reduzido pelo uso de revestimento

WPI = proteína isolada do soro de leite; WPC = proteína concentrada do soro de leite; F = firmeza; WL = perda de massa; AA = ácido ascórbico; C = cor; ST = teste sensorial; BI = índice de escurecimento. Fonte: adaptado de Melorose, Perroy e Careas (2015).

Di Pierro e colaboradores (2011) avaliaram a vida de prateleira do queijo Ricotta com e sem aplicação de revestimento à base de soro de leite combinado com quitosana. As amostras de ricota embaladas em atmosfera modificada contendo o revestimento apresentaram uma redução do crescimento de contaminantes microbianos e uma vida de prateleira superior ao produto não revestido. O revestimento atrasou o desenvolvimento de acidez indesejável, manteve uma textura melhor e não modificou as características sensoriais.

Wagh e colaboradores (2014) desenvolveram e caracterizaram filmes comestíveis à base de proteína concentrada do soro de leite e filmes à base de caseína, e avaliaram a aplicação desses filmes como embalagem para queijo *Cheddar*. Foi observado que o queijo *Cheddar* embalado sem a aplicação do revestimento comestível deteriorou em ritmo mais rápido do que com a camada adicional de filmes de proteínas. Os dados microbiológicos e físico-químicos revelaram a possibilidade de estender a vida de prateleira de produtos lácteos embalados com uma camada adicional de filmes à base de WPC e filmes à base de caseína. A exigência geral de embalagem também pode ser reduzida, uma vez que os filmes de proteína atuaram como barreiras para a transferência de oxigênio. A qualidade sensorial do queijo *Cheddar* não foi afetada pela aplicação da película comestível.

Rossi Marquez e colaboradores (2017) revestiram maçãs, batatas e cenouras recém-cortadas com uma película de proteína do soro do leite e pectina, na presença de transglutaminase como aditivo, e avaliaram as propriedades das amostras revestidas e não

revestidas durante seu armazenamento. Esse revestimento foi eficaz para evitar a deterioração da maçã, batata e cenoura recém-cortadas durante 10 dias de armazenamento, demonstrado através da redução de perda de massa, prevenção de crescimento microbiano, conservação da atividade antioxidante e nenhuma alteração na dureza e mastigabilidade das amostras.

Yang e colaboradores (2017) desenvolveram filmes à base de gelatina incorporadas com óleo essencial de Rosewood ou extrato de pinheiro, com a finalidade de fornecer atividades antioxidantes e antimicrobianas. A película contendo o extrato apresentou propriedades físicas desejáveis, bem como atividades funcionais superiores em relação à película contendo óleo essencial. Dessa forma, o filme incorporado com extrato foi utilizado como revestimento de grãos de uva “Kyoho”. Os grãos de uva revestidos apresentaram populações mais baixas de bactérias aeróbias totais e leveduras, em comparação com o controle após 20 dias de armazenamento. Além disso, os grãos de uva apresentaram menor perda de massa e alterações no teor de antocianinas do que o controle, sugerindo que o revestimento aplicado foi efetivo para a manutenção da qualidade dos grãos de uva durante o armazenamento.

Mohebi e Shahbazi (2017) avaliaram os efeitos de filmes à base de gelatina e quitosana contendo óleo essencial *Ziziphora clinopodioides*, extrato de casca de romã e nanopartículas de celulose, separadamente e em combinação, sobre a sobrevivência de *Listeria monocitogenes* e o prolongamento da vida útil de camarão fresco durante o armazenamento refrigerado. Após 11 dias de armazenamento, todos os camarões envoltos nos filmes tiveram contagem bacteriana e população final de *L. monocitogenes* inferior ao controle, provavelmente devido à propriedade antibacteriana inerente à quitosana, além de apresentarem maiores índices organolépticos.

Lee e colaboradores (2016) desenvolveram filmes à base de gelatina com atividade antimicrobiana e antioxidante pela adição de extrato da folha de *Moringa oleifera* Lam. e aplicaram os filmes em queijo Gouda por um período de 16 dias. O revestimento aplicado inibiu o crescimento microbiano e a oxidação lipídica durante o armazenamento das amostras de queijo.

Azevedo e colaboradores (2018) avaliaram a aplicação de filmes à base de soro de leite incorporados com montmorilonita contendo ácido cítrico em maçãs minimamente processadas com o objetivo de inibir o escurecimento enzimático mantendo as propriedades físico-químicas das amostras. O escurecimento enzimático das maçãs foi reduzido para todos os filmes durante o armazenamento. Os filmes contendo ácido cítrico mantiveram as características de cor e

reduziram a perda físico-química da qualidade das amostras, prolongando a vida de prateleira das maçãs.

Pereira e colaboradores (2018) avaliaram a eficiência antimicrobiana de coberturas comestíveis à base de proteína isolada de soro de leite incorporadas com probióticos para a preservação de presunto fatiado. A aplicação do revestimento comestível probiótico ao presunto fatiado permitiu a diminuição da perda de água e de massa na superfície do presunto durante o armazenamento, mantendo o alimento fresco. Além disso, não foram detectadas alterações de cor ou diferenças nos valores de pH, entre fatias de presunto não revestidas e revestidas, garantindo a qualidade esperada até 45 dias.

2.5.1 Questões de pesquisa

Dentre as alternativas de utilização do soro de leite está a aplicação em embalagens de alimentos. Além das vantagens ambientais, os filmes podem também melhorar a qualidade dos alimentos. O soro de leite também representa uma excelente alternativa para a formulação de filmes proteicos. Com o intuito de melhorar as suas propriedades, películas compósitas com soro do leite e gelatina têm sido desenvolvidas. Estudos demonstraram que a mistura de gelatina com outros polímeros acarreta grande melhora nas propriedades mecânicas e de barreira. Além disso, para aumentar a flexibilidade dos filmes, através do aumento da mobilidade, é necessário a incorporação de plastificante, sendo o glicerol geralmente utilizado em filmes à base de proteínas. A utilização de quitosana, como aditivo antimicrobiano, pode aumentar a vida de prateleira dos produtos embalados.

Após a realização da revisão bibliográfica surgiram diversas dúvidas que estão expressas nas questões a seguir mencionadas.

- É possível a elaboração de filmes a partir de soro de leite desmineralizado e gelatina, havendo compatibilidade entre os componentes?
- É possível a elaboração de filmes a partir de proteína concentrada de soro de leite e gelatina, havendo compatibilidade entre os componentes?
- É possível a elaboração de filmes a partir de proteína isolada de soro de leite incorporado com óleo de semente de uva, havendo compatibilidade entre os componentes?
- Os filmes obtidos apresentam características satisfatórias para aplicação em embalagens de alimentos?
- Os filmes obtidos a partir de soro de leite desmineralizado apresentam propriedades mecânicas, físico-químicas, morfológicas e térmicas inferiores, equivalentes ou superiores

aos filmes obtidos a partir de proteína concentrada do soro de leite e/ou proteína isolada do soro de leite?

- Qual o comportamento dos filmes obtidos durante o armazenamento prolongado sob refrigeração? E sob temperatura ambiente?
- Qual o comportamento dos filmes obtidos quando expostos a fatores que causam degradação?
- Os filmes obtidos podem ser considerados biodegradáveis?
- Qual uma possível aplicação para os filmes à base de soro de leite desmineralizado?

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados para a realização dos experimentos. Também, são apresentadas a metodologia empregada para a preparação da solução filmogênica, caracterização dos filmes, teste de vida de prateleira, teste de envelhecimento acelerado, teste de biodegradabilidade e teste em alimento. A sequência dos experimentos foi realizada de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 3.1.

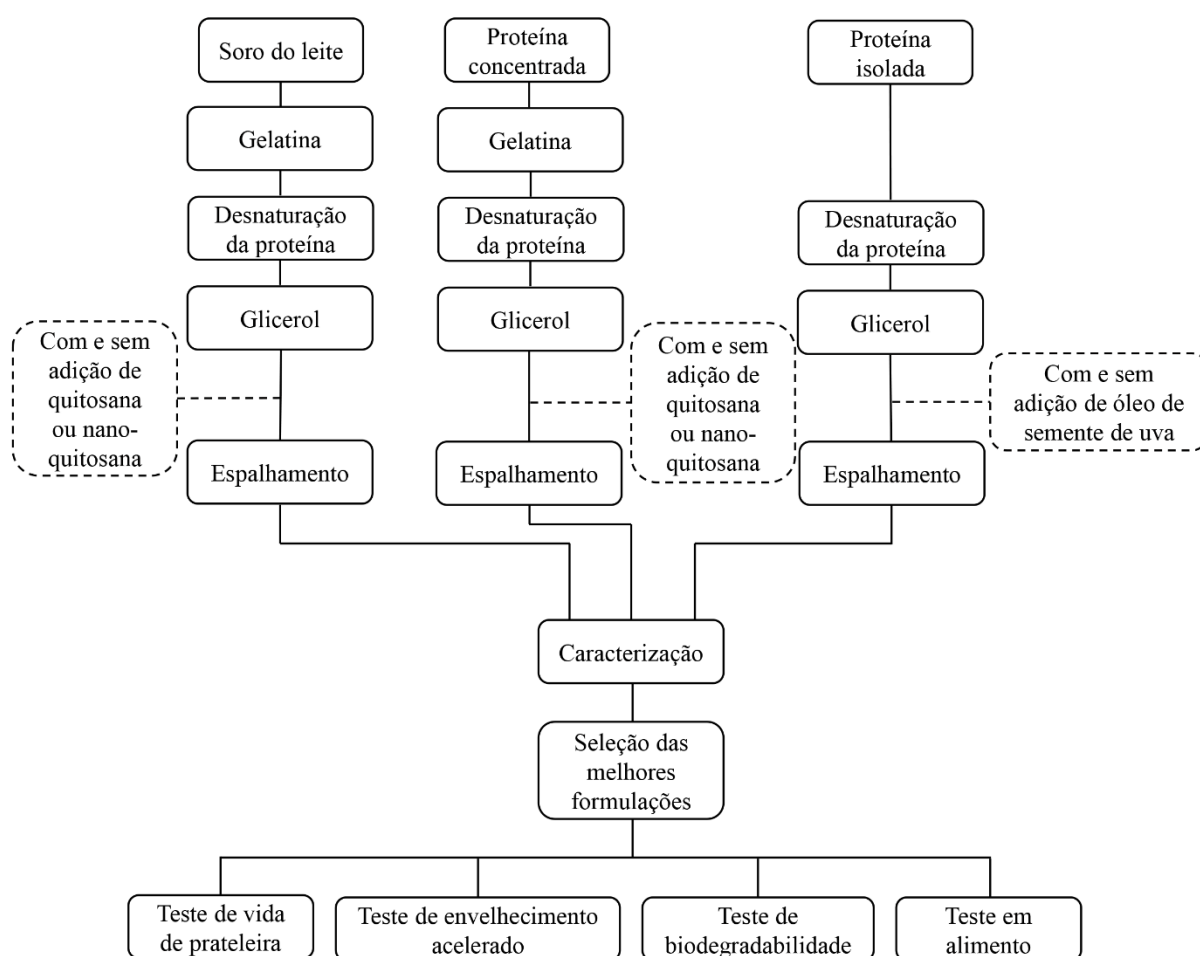


Figura 3.1 Fluxograma esquemático da sequência de experimentos.

3.1 Materiais

Na Tabela 3.1 estão apresentados os materiais utilizados na execução dos experimentos.

Tabela 3.1 Materiais utilizados na execução dos experimentos.

Reagente	Fórmula molecular	Grau de pureza	Fornecedor
Proteína isolada	-	> 99 %	Davisco Foods International
Proteína concentrada	-	> 80 %	Yogomarcas
Soro de leite desmineralizado	-	-	Relat
Gelatina bovina	-	P.A.	Dinâmica
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	85 %	Merck
Óleo de semente de uva	-	-	Econatura
Quitosana	(C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _n	85 %	Sigma-Aldrich
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	P.A.	Dinâmica
Tripolifosfato de sódio	Na ₅ P ₃ O ₁₀	85 %	Sigma-Aldrich
Nitrato de magnésio	Mg(NO ₃) ₂	P.A.	Dinâmica

Para o teste de biodegradabilidade (degradação biológica) dos filmes, utilizou-se solo fértil adquirido no Centro de Ciências Agrárias e Biológicas (Bloco 74), da Universidade de Caxias do Sul; areia grossa, obtida na IBC Indústria de Britas Chemello, e esterco de cavalo, coletado junto ao Posto Policial de Cavalaria Montada, dentro da Cidade Universitária da Universidade de Caxias do Sul. Também foram utilizados copos transparentes de polipropileno (PP) de 300 mL e embalagens de polipropileno, com dimensões de 80 × 100 mm para o acondicionamento das amostras no solo.

3.2 Caracterização das matéria-primas

A caracterização do soro de leite, da proteína concentrada do soro de leite e da proteína isolada do soro de leite foi realizado através de análise centesimal, eletroforese, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e análises térmicas através de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de termogravimetria (TGA).

3.2.1 Composição química

A determinação da composição foi realizada de acordo com a AOAC (2012), sendo determinado o teor de umidade, de cinzas, de proteínas, de lipídeos e de carboidratos.

Umidade

O método utilizado foi o de gravimetria, através da secagem em estufa ($105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), baseado na remoção da água por aquecimento. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio, com massas previamente determinadas, ficando em estufa até a secagem. Os cadinhos contendo as amostras foram, então, resfriados à temperatura ambiente, em dessecador, tendo sua massa novamente determinada. Logo após, os cadinhos retornaram à estufa e este procedimento foi repetido até a obtenção de massa constante (por aproximadamente 5 h). Foi calculada, então, a porcentagem de umidade das amostras. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Cinzas

O método empregado foi o de calcinação, através da incineração em mufla, no qual toda a matéria orgânica foi queimada. Cada amostra foi colocada em um cadinho de porcelana, com massa previamente estabelecida e permaneceu na mufla ($550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) até total queima da matéria orgânica. A diferença entre a massa da amostra mais cadinho e a massa do cadinho forneceu a massa das cinzas da amostra. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl, no qual avaliou-se o teor de nitrogênio total de origem orgânica, utilizando-se 0,3 g de amostra em tubo para digestão. O procedimento do método baseou-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico e mistura catalisadora contendo sulfato de cobre e sulfato de potássio para acelerar a reação. Assim, todo o carbono e hidrogênio foram oxidados a gás carbônico e água. O nitrogênio da proteína foi reduzido e transformado em sulfato de amônio. Destilou-se a amostra digerida em meio básico por adição de hidróxido de sódio 40%, para a liberação da amônia. A amônia foi recolhida em solução de ácido bórico, formando borato de amônio. O borato de amônio formado foi quantificado por titulação com ácido clorídrico padronizado com carbonato de sódio. Utilizou-se o fator de conversão de 6,38. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

Lipídeos

O método utilizado baseia-se em uma extração de gordura a frio utilizando mistura de três solventes, clorofórmio-metanol-água, em proporção na qual os três solventes formam solução homogênea. Para a determinação de lipídeos, 4,0 g da amostra foram colocadas em tubos de ensaio e adicionou-se clorofórmio, metanol e água destilada. Os tubos foram tampados

hermeticamente e agitados por trinta minutos. Adicionou-se, então, mais clorofórmio e solução de sulfato de sódio 1,5 % e agitou-se por mais dois minutos. Ocorreu, então, a separação total do clorofórmio, o qual carregou os lipídeos (camada inferior do tubo) e foi transferido para um béquer. O solvente foi eliminado por evaporação em estufa a 60 °C. O teor de lipídeos foi calculado através da diferença entre o béquer vazio e o béquer contendo a solução evaporada de lipídeos. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

Carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença: calculou-se a média da porcentagem de água, proteínas, lipídeos e cinzas e o restante foi considerado carboidrato.

3.2.2 Eletroforese em gel

A análise qualitativa das proteínas presentes nas amostras de WP, WPC e WPI foi realizada através de eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins) (LAEMMLI, 1970).

Brevemente, a separação eletroforética foi realizada em gel descontínuo, formado por um gel concentrador (1 cm) contendo 4,5 % de acrilamida em tampão 125 mM Tris-HCl pH 6,8 e um gel separador (7 cm) contendo 15 % de acrilamida em tampão 375 mM Tris-HCl pH 8,8, ambos contendo 0,1 % de SDS. Como tampão de corrida foi utilizado 100 mM Tris-glicina pH 8,3. A corrida foi realizada em cuba vertical a 10 °C com corrente de 50 V no gel concentrador e 100 V no gel separador. As amostras foram misturadas com um volume (1:1) de “Loading Buffer 2x” (5 % de 2- mercaptoetanol, 0,4 % de SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2 % de azul de bromofenol, 10 % glicerol) e aquecidas a 100 °C em banho Maria por 5 min. Volumes de 20 µl foram aplicados nos géis. Após a corrida, as proteínas foram fixadas e coradas com 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R250 em metanol: ácido acético: água (30:7:63) (v/v) durante 4 h. A descoloração foi realizada com trocas sucessivas de metanol:ácido acético:água (30:7:63) (v/v). Em todos os géis foi aplicado um padrão de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (Gibco BRL, 10747-012) contendo marcadores de 10 a 250 kDa.

3.2.3 Caracterização química

A fim de avaliar os grupos funcionais presentes na estrutura química das amostras foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das matérias-primas (WP, WPC, WPI, glicerol, gelatina e OSU), no equipamento 640-IR da Varian (EUA), no modo de Reflexão Total Atenuada (ATR) com ponta de cristal de diamante.

Para melhorar a relação sinal-ruído, 32 scans foram tomados com uma resolução de 4 cm^{-1} em uma faixa de comprimento de onda de 550 a 4500 cm^{-1} .

3.2.4 Análises térmicas

As análises térmicas realizadas nas amostras em estudo incluíram a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a termogravimetria (TGA).

3.2.4.1 Calorimetria diferencial de varredura

Os ensaios foram realizados para as matérias-primas (WP, WPC, WPI, glicerol, gelatina e OSU) utilizando o equipamento DSC-60 da Shimadzu (Japão). A massa das amostras variou de 10 a 15 mg. As taxas de aquecimento e resfriamento foram fixadas em $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O seguinte programa de temperatura foi utilizado: aquecimento a partir de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, arrefecimento até $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, novo aquecimento até $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de arrefecimento até $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um porta amostra de alumínio vazio foi utilizado como referência e o sistema de arrefecimento utilizou refrigeração por nitrogênio. As temperaturas de transição vítrea (T_g) foram determinadas, a partir das curvas de DSC resultantes.

3.2.4.2 Termogravimetria

A estabilidade térmica das matérias-primas (WP, WPC, WPI, glicerol, gelatina e óleo de semente de uva) foi realizada no equipamento STA 449F3 da Netzsch (Alemanha) sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min^{-1} . A massa das amostras utilizadas foi de aproximadamente $10 \pm 1\text{ mg}$. As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente ($25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) até $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A temperatura inicial de decomposição (T_d), a temperatura máxima de degradação (T_{max}) e a correspondente perda de massa e percentual de resíduo foram determinados.

3.3 Preparação dos aditivos

Os aditivos quitosana e nano-quitosana, utilizados nas diferentes formulações precisaram ser preparados, e os detalhes são apresentados nos subitens a seguir. O óleo de semente de uva foi utilizado sem nenhum tratamento prévio.

3.3.1 Quitosana

Uma suspensão de 1% (m/V) foi preparada pela adição de $1,0\text{ g}$ de quitosana em 50 mL de água destilada e 50 mL de ácido acético 2% (m/V). A solução permaneceu em agitação

contínua a 100 rpm em agitador magnético modelo 752A da Fisatom (Brasil) durante 3 h (AHMAD et al., 2011).

3.3.2 Nano-quitosana

As nanopartículas de quitosana (nano-quitosana) foram obtidas através do processo de gelificação iônica (CALVO; REMUNAN-LOPEZ, 1997), que consiste na interação entre a quitosana carregada positivamente e o tripolifosfato de sódio (STTP) carregado negativamente (KOCAK et al., 2012). A nano-quitosana foi obtida através da adição de solução de STTP diluído em água destilada em suspensão de quitosana 1 %, na proporção (em massa) de quitosana para STTP de 5:1 sob agitação magnética constante (100 rpm) em agitador magnético modelo 752A da Fisatom (Brasil) e em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (BAO; LI; ZHANG, 2008).

3.4 Preparação da solução filmogênica

Uma solução aquosa (pH 7,0) de soro de leite desmineralizado e gelatina foi homogeneizada sob agitação magnética constante (50 rpm) em agitador magnético por 10 min e à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A solução foi então aquecida a 90 °C por 30 min sob agitação magnética constante (50 rpm) em agitador magnético, para realizar a desnaturação completa das proteínas. Depois de arrefecer a solução até a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), diferentes concentrações de plastificante (glicerol) e aditivo (quitosana ou nano-quitosana) foram adicionados e a solução resultante foi homogeneizada sob agitação magnética constante (50 rpm) em agitador magnético modelo 752A da Fisatom (Brasil) por 30 min. Por fim, a solução foi desgaseificada em um banho de ultrassom (para remoção de bolhas e espuma) modelo USCD 1400A da Unique (Brasil) por 15 min. Na Figura 3.2 está ilustrado o procedimento da preparação da solução filmogênica de soro de leite desmineralizado e gelatina.

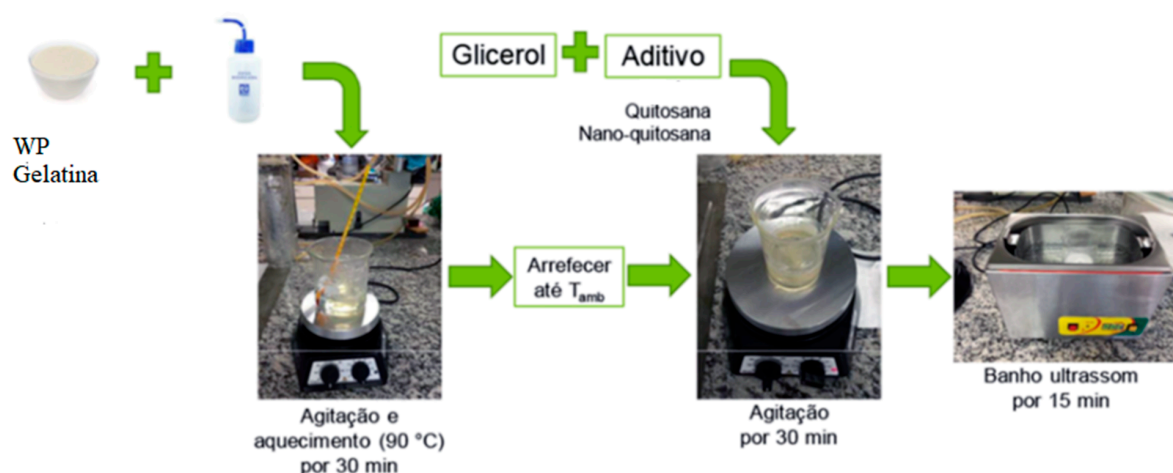


Figura 3.2 Ilustração do procedimento de preparação da solução filmogênica dos filmes à base de soro de leite desmineralizado e gelatina.

Foram realizados testes preliminares, onde se variou a concentração de soro de leite desmineralizado (3 %, 5 % e 10 % m/V), a concentração de glicerol (0 %, 30 %, 50 %, 70 %, 100 % e 120 % massa/massa seca de soro de leite), a concentração de gelatina (0 %, 1 %, 2 % e 3 % m/V) e adição de quitosana e nano-quitosana (0,3 % massa/massa seca de soro de leite). A utilização de quitosana não foi variada, uma vez que amostras não contendo o aditivo apresentaram crescimento microbiano após 2 dias, e a adição de 0,3 % massa/massa seca de soro de leite de quitosana se mostrou eficaz como agente anti-microbiano.

A preparação dos filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina seguiu o mesmo procedimento que os filmes à base de soro de leite e gelatina, porém utilizando WPC. Na Figura 3.3 está ilustrado o procedimento utilizado de forma resumida.

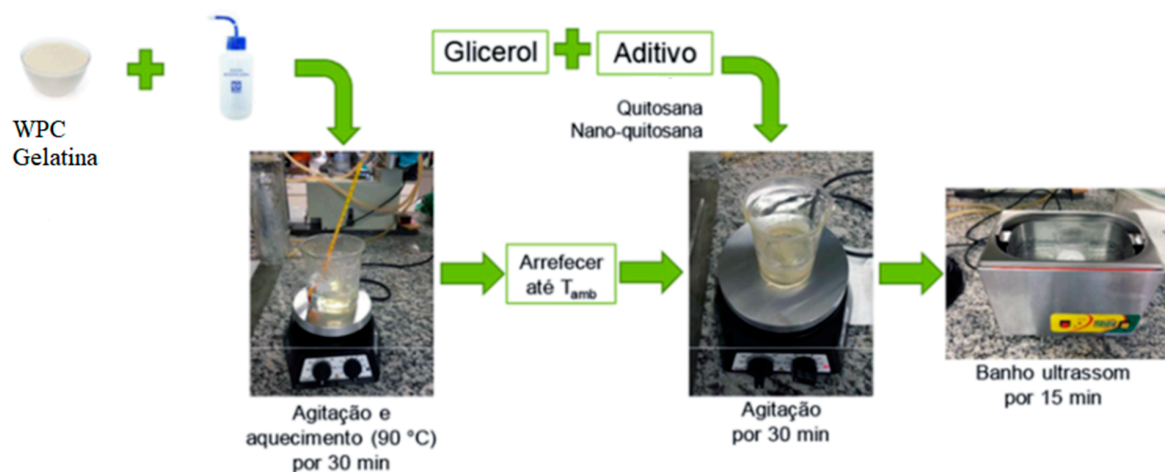


Figura 3.3 Ilustração do procedimento de preparação da solução filmogênica à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina.

Foram realizados testes preliminares, onde se variou a concentração de WPC (3 %, 5 % e 10 % m/V), a concentração de gelatina (0 %, 1 %, 2 % e 3 %), a concentração de glicerol (0 %, 30 %, 50 %, 70 %, 100 % e 120 % massa/massa seca de WPC) e adição de quitosana e nano-quitosana (0,3 % massa/massa seca de WPC). Da mesma forma que ocorreu com o soro de leite, não se variou a concentração de quitosana, uma vez que a utilização de 0,3 % massa/massa seca de WPC se mostrou eficaz como agente anti-microbiano.

Para a proteína isolada do soro de leite, o procedimento adotado foi semelhante ao do soro de leite desmineralizado e do WPC, porém sem a utilização de gelatina e o aditivo utilizado foi o óleo de semente de uva (0 %, 1 %, 10 %, 20 % e 40 % massa/massa seca de WPI). Um resumo do procedimento utilizado é apresentado na Figura 3.4.

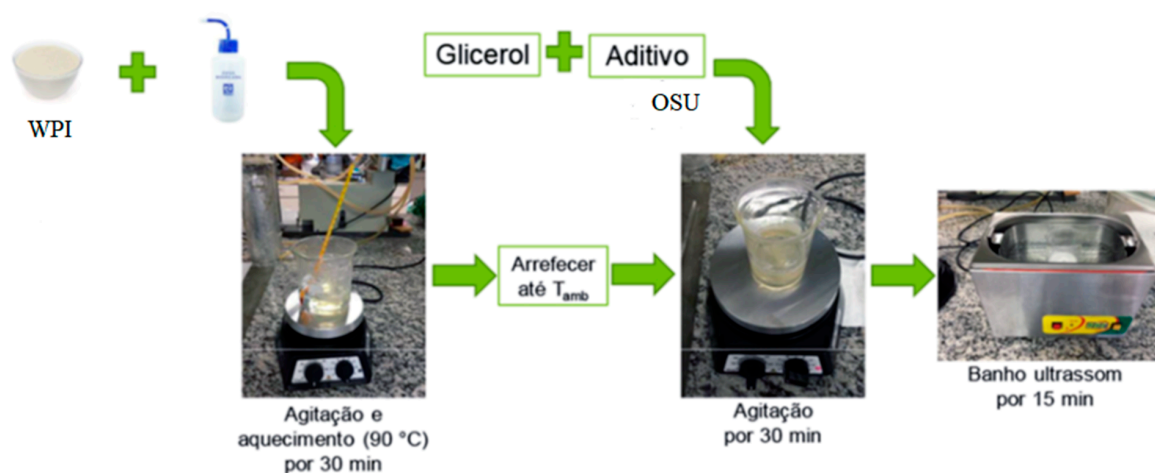


Figura 3.4 Ilustração do procedimento de preparação da solução filmogênica à base de proteína isolada do soro de leite.

As soluções filmogênicas (50 mL) foram submetidas à análise de viscosidade cinemática imediatamente após a sua preparação. Foi utilizado um viscosímetro rotativo analógico Q860A2 da Quimis (Brasil) e a análise foi realizada em triplicata a 25 ± 2 °C.

3.5 Obtenção dos filmes

A técnica utilizada para a obtenção dos filmes foi a do espalhamento em placas de Petri (*casting*). Placas de Petri de 10 cm de diâmetro revestidas com teflon foram utilizadas como suporte para a preparação dos filmes. Para todas as formulações, 10 g de solução filmogênica foram vertidos nas placas, as quais foram colocadas sobre uma superfície nivelada a fim de se obter películas com espessura o mais homogênea possível. As placas foram submetidas à secagem durante aproximadamente 24 h a temperatura de 23 ± 2 °C e umidade relativa (UR)

$33 \pm 5 \%$. Todos os filmes foram acondicionados em um dessecador com UR controlada de $50 \pm 5 \%$ (solução saturada de nitrato de magnésio) armazenado em uma sala com temperatura controlada a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h.

3.6 Caracterização dos filmes

A caracterização dos filmes foi realizada em relação às propriedades: mecânicas, físicas, morfológicas, composição química, de barreira e estabilidade térmica.

3.6.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de resistência à tração e ao alongamento na ruptura foram realizadas em texturômetro DL2000 da Emic (Brasil). Os ensaios foram realizados com três corpos de prova de acordo com a norma ASTM D882-10 (ASTM, 2010), com adaptações. Os filmes foram cortados em tiras com $70 \times 20 \text{ mm}$. A distância inicial das garras foi de 50 mm, velocidade de tração de 1 mm s^{-1} , com uma célula de carga de 30 N.

3.6.2 Propriedades físicas

As propriedades físicas incluem espessura, gramatura, solubilidade em água e em etanol, opacidade, umidade e ângulo de contato.

3.6.2.1 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com micrômetro digital 0-25 mm Mitutoyo (EUA), em dez pontos diferentes de cada amostra, em triplicata.

3.6.2.2 Gramatura

Para o cálculo da gramatura dos filmes utilizou-se a razão entre a quantidade de solução dividida pela área ocupada pelo filme. A gramatura é dada pela Equação 3:

$$G = 10000 \frac{\rho}{A} \quad (3)$$

onde G é a gramatura (g cm^{-2}), ρ é a massa da amostra (g) e A é a área da amostra (cm^2).

3.6.2.3 Opacidade

A opacidade dos filmes foi calculada através da Equação 4 (MOHAJER; REZAEI; HOSSEINI, 2017):

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{A_{600}}{X} \quad (4)$$

sendo A_{600} a absorvância a 600 nm e X a espessura do filme (mm). Amostras com tamanho de 2×2 cm foram inseridas no espectrofotômetro DU 530 da Beckman (EUA) e a absorvância foi lida. A análise foi realizada em triplicata.

3.6.2.4 Solubilidade em água e em etanol

A solubilidade dos filmes em água e em etanol foi realizada, em triplicata, segundo metodologia adaptada de Soazo, Rubiolo, & Verdini (2011). Amostras com tamanho de 2×2 cm foram secas em estufa TecnoLab (Brasil) a 70°C durante 24 h e pesadas. Em seguida foram imersas em 50 mL de água destilada ou de etanol a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Após foram filtradas, secas em estufa TecnoLab (Brasil) a 70°C por 24 h, e novamente pesadas. A solubilidade foi calculada como porcentagem de matéria seca solubilizada e a análise foi realizada em quintuplicata.

3.6.2.5 Umidade

O teor de umidade dos filmes foi determinado por gravimetria, por meio da perda de massa sofrida por uma amostra de filme após permanecer 24 h em uma estufa TecnoLab (Brasil) a 105°C (AOAC, 2012). Cinco repetições foram feitas para cada amostra.

3.6.2.6 Ângulo de contato

Para avaliar o ângulo de contato água/filme, uma microgota de água deionizada foi adicionada cuidadosamente na superfície dos filmes em três pontos diferentes (medida estática). As medidas foram realizadas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 5\%$. As imagens de cada gota imediatamente após a gota ser pingada foram capturadas com auxílio de câmera digital de alto foco. A verificação do ângulo de contato (Θ) foi obtida com auxílio do software Surftens® 3.0. As medidas foram realizadas em triplicata e foi considerada a média desses resultados. Considerou-se a superfície hidrofílica para $\Theta < 90^\circ$ e hidrofóbica para $\Theta > 90^\circ$.

3.6.3 Propriedades morfológicas

A morfologia dos filmes foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento EVO MA10 da Zeiss (Alemanha), utilizando uma voltagem de aceleração de 5 kV. As amostras dos filmes foram fraturadas com nitrogênio líquido e revestidas com ouro para análise da seção transversal.

3.6.4 Caracterização química

A caracterização química dos filmes foi realizada da mesma forma que a descrita para as matérias-primas, conforme item 3.2.3.

3.6.5 Propriedades de barreira

A análise de permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi realizada de acordo com a norma ASTM E-96 (2016) com modificações (McHugh, Avenabustillos, & Krochta, 1993). Água destilada foi colocada no interior de copos circulares e uma amostra de filme foi colocada na abertura do copo. Os copos foram armazenados sob temperatura e umidade relativa (UR) controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e $50 \pm 3\%$ de UR). A perda de massa dos copos foi monitorada ao longo de 8 h, com massas registradas em intervalos de 30 min nas duas primeiras horas e após a cada 1 h. A análise foi realizada em triplicata.

3.6.6 Análises térmicas

As análises térmicas realizadas nos filmes incluíram calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA).

3.6.6.1 Calorimetria diferencial de varredura

A calorimetria diferencial de varredura dos filmes foi realizada da mesma forma que a descrita para as matérias-primas, conforme item 3.2.4.1.

3.6.6.2 Termogravimetria

A análise termogravimétrica dos filmes foi realizada da mesma forma que a descrita para as matérias-primas, conforme item 3.2.4.2.

3.7 Teste de vida de prateleira

O teste de vida de prateleira foi realizado com as formulações selecionadas como melhores, com base nas caracterizações realizadas (item 3.6). Para o teste, os filmes previamente preparados foram dispostos de duas formas: acondicionados no ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$ e $77 \pm 3\%$ de UR) e armazenados sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2\%$ de UR), sob a localização de latitude -29.163696 e longitude -51.149038. As amostras foram armazenadas por um período de seis meses (25/08/2016 à 21/02/2017), sendo estas submetidos a análise visual, ângulo de contato, espessura, propriedades mecânicas e opacidade nos dias 7, 14, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180, após início do teste de vida de prateleira. A metodologia adotada foi baseada na metodologia proposta por Osés e colaboradores (2009), com adaptações.

3.7.1 Análise visual

As amostras dos filmes foram fotografadas e analisadas visualmente quanto à homogeneidade da superfície (presença de partículas insolúveis), uniformidade, alteração na coloração, continuidade (avaliação quanto à presença de partes quebradiças ou rupturas) e proliferação visível de microrganismos (fungos, por exemplo).

3.7.2 Ângulo de contato

A determinação do ângulo de contato foi realizada da mesma forma que a descrita na caracterização dos filmes, conforme item 3.6.2.6.

3.7.3 Espessura, propriedades mecânicas e opacidade

A determinação da espessura, das propriedades mecânicas e da opacidade dos filmes foi realizada da mesma forma que a descrita na caracterização dos filmes, de acordo com os itens 3.6.2.1, 3.6.1 e 3.6.2.3, respectivamente.

3.8 Teste de envelhecimento acelerado

A iniciação das reações de degradação foto-oxidativa dos filmes à base de soro de leite foi realizada em uma câmara de envelhecimento acelerado com comprimento de onda de 313 nm, da marca Comexim Matérias Primas Ind. Com. Ltda. (Brasil), segundo a norma ASTM G 154-00 adaptada (ASTM, 2014), intercalando a exposição à atmosfera de condensação a 40 °C e radiação UVB a 60 °C, a cada 4 h, finalizando o ciclo a cada 8 h. Na câmara foram utilizadas lâmpadas fluorescentes com vapor de mercúrio, modelo TL 40W/12, da marca Philips (Holanda). As amostras dos filmes selecionados foram cortadas no tamanho de 6 × 6 cm, sendo retiradas da câmara após 80, 160, 240, 360 e 480 h de exposição ao envelhecimento acelerado, correspondendo a uma simulação de 2, 4, 6, 9 e 12 meses, respectivamente. Foram realizadas análises de caracterização química, massa residual e análise térmica (TGA) dos filmes. A caracterização química e análise térmica foi realizada conforme apresentado nos os itens 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente.

3.8.1 Massa residual

As amostras dos filmes selecionados (S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10) foram submetidas à análise de massa residual (M_r) em %, sendo essa calculada pela Equação 5.

$$M_r (\%) = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

onde m_f é a massa final da amostra em gramas e m_i a massa inicial, em gramas. As análises foram realizadas em triplicata.

3.9 Teste de biodegradabilidade (degradação biológica)

Para a realização do teste de biodegradabilidade, foi necessária a preparação do ambiente para degradação biológica, conforme é apresentado a seguir.

3.9.1 Preparação do ambiente para biodegradabilidade

A avaliação da suscetibilidade microbiana das amostras foi realizada conforme a norma ASTM G 160-03 (ASTM, 2004). Para isso, preparou-se um solo simulado a partir da mistura de 5 kg de solo fértil, 5 kg de areia grossa e 5 kg de esterco de cavalo, totalizando 15 kg de substrato. Os materiais foram pesados em uma balança Bel modelo THB-600 (Brasil).

A terra e a areia foram peneiradas em uma peneira de 3,5 *mesh* da marca Bertel (Brasil), a fim de remover as impurezas maiores e novamente foram pesadas de modo que o peso final permanecesse em 5 kg cada. O esterco de cavalo não passou pela etapa de peneira, pois apresentava umidade elevada para o processo de peneiramento. A mistura dos três substratos, terra, areia e esterco de cavalo foi realizada em um misturador rotacional semiautomático (betoneira) da marca Horbach (Brasil), durante 20 min. O solo preparado foi armazenado para maturação durante um período de 3 meses, em condições de temperatura e umidade relativa ambiente ($20 \pm 5^\circ\text{C}$ e $77 \pm 3\%$ de UR).

3.9.2 Monitoramento do solo

O solo simulado foi monitorado antes e após o experimento de biodegradabilidade, através de análise de pH, umidade, sólidos voláteis, carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LASAM) da Universidade de Caxias do Sul, através da coleta de aproximadamente 500 g de solo simulado, retirados de diferentes pontos.

Semanalmente o composto foi revolvido e os parâmetros de temperatura e umidade monitorados, devendo a umidade permanecer entre 20 e 30 % no período de realização do teste, segundo a norma ASTM G160-03 (ASTM, 2004). O valor da umidade do solo foi monitorado semanalmente e determinado por meio da perda de massa sofrida pela amostra após 24 h em uma estufa TecnoLab (Brasil) a 105°C (AOAC, 2012). Cinco repetições foram feitas para cada amostra. Conforme o resultado das análises, os devidos ajustes de umidade foram realizados a fim de atender às especificações da norma.

3.9.3 Teste do algodão

Após o período de três meses de maturação, foi realizado o teste de degradação do tecido de algodão, recomendado pela norma, e que indica a condição ideal para início do teste de biodegradabilidade. O teste consistiu de ensaiar a resistência à tração de 5 corpos de prova de tecido 100 % algodão, com gramatura de 414 g m^{-2} nas dimensões de $100 \times 20 \text{ mm}$, antes e após 5 dias de exposição ao solo simulado. Os corpos de prova do tecido de algodão foram ensaiados em um texturômetro DL2000 da Emic (Brasil), com célula de carga de 200 kgf, com extensômetro interno, e velocidade de 50 mm min^{-1} .

Após a remoção dos corpos de prova, os mesmos não foram lavados, apenas removeu-se a cobertura superficial de solo e na sequência, foram encaminhados para acondicionamento por 24 h em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \pm 10 \%$ de UR.

3.9.4 Avaliação da biodegradabilidade dos filmes

A suscetibilidade microbiana dos filmes selecionados foi avaliada pela disposição de amostras cortadas nas dimensões $20 \times 20 \text{ mm}$, em triplicata, no solo simulado, de acordo com a norma ASTM G160-03 (ASTM, 2004). As amostras foram colocadas dentro de embalagens de material inerte compostas de polipropileno (Figura 3.5), com dimensões de $80 \times 100 \text{ mm}$, mantendo o filme em contato com o solo e facilitando a retirada da amostra para posterior análise.

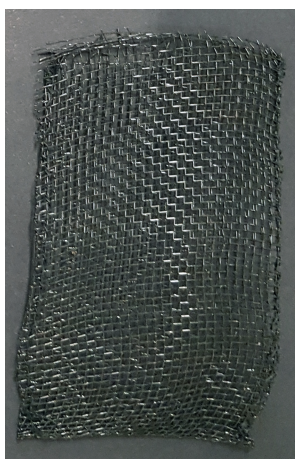


Figura 3.5 Imagem da embalagem de material composto de polipropileno utilizada como suporte de amostras.

O solo utilizado no experimento foi dividido em partes iguais e distribuído em copos transparentes de polipropileno (PP) de 300 mL cada (Figura 3.6), onde as amostras foram incubadas até sua completa degradação, no interior de uma estufa agrícola (Figura 3.7)

construída na parte externa do Centro de Ciências Agrárias e Biológicas (Bloco 74) da Universidade de Caxias do Sul, localizada na latitude -29.163185 e longitude -51.143458.

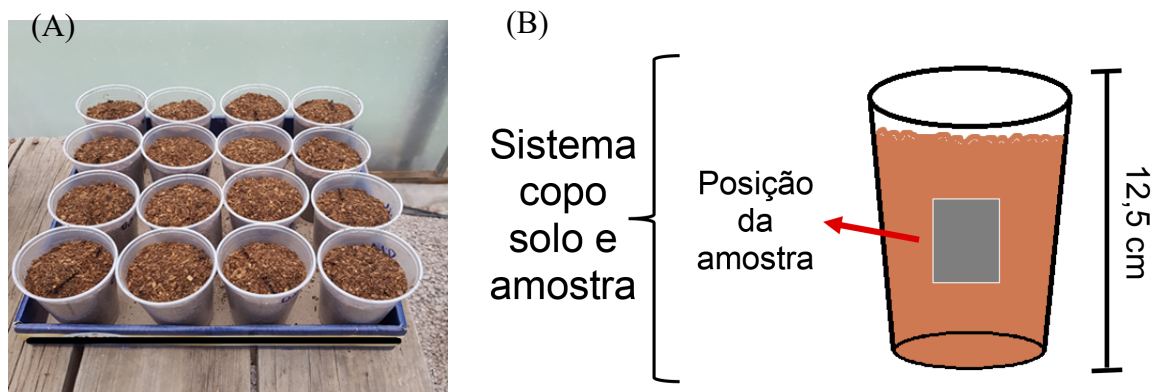


Figura 3.6 Imagem das amostras dispostas em copos transparentes (A) e ilustração da posição da amostra no sistema copo, solo e amostra (B).



Figura 3.7 Imagens da estufa agrícola utilizada para o acondicionamento das amostras.

As amostras foram acompanhadas diariamente ou semanalmente, onde controlou-se a variação da temperatura e da umidade do ambiente, através do *site* climatempo.com.br, do interior da estufa agrícola utilizada através do termohigrômetro digital Incoterm (Brasil), com função máxima e mínima do período estabelecido. Para a medida da temperatura do solo, utilizou-se um termômetro digital tipo espeto, marca Akrom (Brasil) e a umidade com o microcontrolador programável acoplado com sensor de umidade do solo, Arduino Uno. O teste de biodegradabilidade ocorreu no período da primavera, do dia 03 de outubro de 2017 ao dia 12 de dezembro de 2017.

Após a coleta da temperatura e umidade, os filmes foram removidos cuidadosamente com auxílio de pinça e o excesso de solo depositado sobre a amostra foi removido para posterior análise visual, massa residual e caracterização química.

A análise visual dos filmes, a massa residual e a caracterização química dos filmes e do solo foram realizadas da mesma forma apresentada nos itens 3.7.1, 3.8.2 e 3.2.3,

respectivamente. A caracterização química dos filmes foi realizada no primeiro dia e no último dia antes da completa degradação das amostras.

3.10 Teste em alimento

Foram realizados dois tipos de teste em alimento: direto e indireto, durante um período de 10 dias. O alimento selecionado para realização dos testes foi o queijo minas frescal da marca Santa Clara, cujo tempo de vida de prateleira é de cinco dias após aberto. Todas as amostras foram coletadas do mesmo lote do produto conforme apresentado na Figura 3.8.



Figura 3.8 Imagem do alimento na embalagem (A) e do lote (B) utilizados.

A escolha de um alimento lácteo se deve ao fato de que os filmes são à base de soro do leite, contendo em sua formulação lactose e proteínas do leite. Desta forma, não há necessidade de informar que a embalagem contém esses constituintes, uma vez que muitos consumidores apresentam alergia ou intolerância aos mesmos.

3.10.1 Análise direta do queijo minas frescal

Na análise direta, o queijo foi lavado em água corrente e foram cortadas amostras na forma de cubos nas dimensões de $2,0 \times 2,0 \times 2,0$ cm. As amostras foram mergulhadas por 30 s na solução filmogênica das formulações selecionadas, posteriormente foram colocados em bandejas plásticas e deixadas para secar por 5 min. Após as amostras foram armazenadas sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) conforme imagem apresentada na Figura 3.9. A condição controle foi estipulada como amostra de queijo sem recobrimento filmogênico.



Figura 3.9 Imagem das amostras de queijo minas frescal para o teste em alimento com aplicação direta.

Todos as análises foram realizadas em triplicata. Pelo fato de o filme ser comestível, ao formar uma fina camada em torno do alimento, não é necessário separá-lo no momento da ingestão.

3.10.2 Análise indireta do queijo minas frescal

Na análise indireta, o preparo das amostras de queijo seguiu a mesma metodologia empregada na análise direta. Após o corte, as amostras foram imediatamente colocadas nos potes plásticos, que foram fechados com os filmes, utilizando-se cola de silicone; esse tratamento foi denominado sistema fechado com ar ambiente. Os sistemas de embalagem constituíram-se em potes plásticos, contendo pedaços de queijo minas, fechados com filmes à base de soro de leite (Figura 3.10). Os sistemas estudados foram: aberto (pote + queijo); sistemas fechados (pote + queijo + PVC) e (pote + queijo + filme), sendo o filme variado entre as formulações selecionadas em função dos resultados de caracterização.

A condição controle foi estipulada como cubos de queijo em potes sem o fechamento (sistema aberto). As embalagens foram armazenadas sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR). Todos as análises foram realizadas em triplicata.



Figura 3.10 Imagem das amostras de queijo minas frescal para o teste em alimento com aplicação indireta.

3.10.3 Análises microbiológicas e físico-químicas das amostras de queijo

As amostras de queijo, tanto da análise direta quanto da análise indireta, foram submetidas a análises microbiológicas, perda de massa, acidez titulável, pH, aspecto visual e opacidade. As análises foram realizadas nos dias 0, 2, 6 e 10 dos experimentos.

A massa residual, o aspecto visual e a opacidade foram determinadas de acordo com o apresentado nos itens 3.8.2, 3.7.1 e 3.6.2.3, respectivamente.

3.10.3.1 Análise microbiológica

Os ensaios microbiológicos se destinaram a verificar a presença de elementos patogênicos, ou seja, causadores de doenças e intoxicações alimentares. A presença dessas bactérias, acima dos limites estabelecidos na legislação, indica manipulação incorreta, como também condições higiênicas inadequadas no processo produtivo. As análises de coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras foram realizadas no Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA) da Universidade de Caxias do Sul. A metodologia empregada para cada análise será apresentada a seguir.

Coliformes Termotolerantes a 45°C

Os coliformes englobam um grupo de bactérias encontradas no intestino de animais de sangue quente, incluindo o homem, mamíferos e aves. Sua presença indica falta de condições higiênicas adequadas em uma ou mais etapas do processo produtivo. A contaminação ocorre quando o número de coliformes ultrapassa o máximo permitido pela legislação, e seus sintomas incluem diarreia semelhante à da cólera, dores abdominais, febre baixa, náuseas e mal-estar geral.

A determinação de coliformes termotolerantes foi realizada através da determinação quantitativa pela técnica de contagem em profundidade de acordo com a método 991.14 por petrifilm – AFNOR 3M 01/2 – 09/89C (AOAC, 2012).

***Salmonella* spp (Salmonela)**

A salmonela (*salmonella* spp.) oferece graves riscos à saúde. Essa bactéria, que pode ser de várias espécies, causa uma infecção cujos sintomas principais aparecem de 12 a 72 h após a ingestão de alimento contaminado, duram de 4 a 7 dias e incluem diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, mal-estar, desidratação e calafrios, sendo que em crianças, idosos, portadores de HIV, pacientes com câncer e diabetes, a perda de líquido provocada pode levar a uma desidratação fatal.

A determinação de *salmonella* spp. foi realizada através da determinação quantitativa pela técnica de presença/ausência conforme norma ISO 6579 (2007).

***Staphylococcus aureus* (Estafilococos coagulase positivos)**

A bactéria estafilococos (*Staphylococcus aureus*) está relacionada com sintomas graves de intoxicação alimentar, como cólicas, sudoreses, vômitos e, nos casos mais graves, dores de cabeça, dores musculares e alteração na pressão arterial, que aparecem rapidamente, de 20 min

a 2 h após a ingestão do alimento contaminado. A gravidade da contaminação depende de fatores como a quantidade de alimento contaminado que foi ingerido, a quantidade de toxina presente no alimento ingerido e o estado prévio de saúde do paciente.

A determinação quantitativa de *Staphylococcus aureus* foi realizada através da técnica de contagem de acordo com o método 2003.07, 2003.08 e 2003.11 por petrifilm AFNOR 3M 01/9 – 04/03 (AOAC, 2012).

Bolores e leveduras

A determinação quantitativa de bolores e leveduras foi realizada através da técnica de contagem em superfície pelos métodos OMA 2014.05 Enumeration of Yeast and Mold in Food 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate (AOAC, 2012).

3.10.3.2 Acidez total titulável

Para a determinação da acidez total titulável das amostras de queijo, foram adicionadas 10 g de amostra em 100 mL de água destilada e a solução permaneceu sob agitação magnética constante (100 rpm) em agitador magnético modelo 752A da Fisatom (Brasil) por 30 min e em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), de forma a eliminar grumos. A solução foi então titulada com hidróxido de sódio 0,1 M utilizando 2 a 3 gotas do indicador fenolftaleína.

A acidez total é expressa em gramas de ácido por 100 g de amostra através da Equação 6:

$$ATT_{(g/100\ g)} = \frac{n \times M \times Eq}{10 \times p} \quad (6)$$

onde $ATT_{(g/100\ g)}$ é a acidez total titulável, n é o volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL), M é a normalidade da solução de hidróxido de sódio, Eq é o equivalente-grama do ácido tartárico (75,04) e p é a massa de amostra (g) (BRASIL, 1986).

3.10.3.3 pH

Para a determinação do pH das amostras de queijo, foram adicionadas 10 g de amostra em 100 mL de água destilada e a solução permaneceu sob agitação constante (100 rpm) em agitador magnético por 30 min e em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), de forma a eliminar grumos. A medida do pH da solução foi realizada utilizando um medidor de pH digital modelo 211 instrumentos Hanna PBI International (EUA).

3.10.3.4 Análises dos filmes

As amostras de filmes utilizadas para a análise indireta foram submetidas a análises de umidade e opacidade, nos dias 0 e 10.

Umidade

O teor de umidade foi determinado por meio da perda de massa sofrida pelo filme após 24 h em uma estufa TecnoLab (Brasil) a 105°C (AOAC, 2012).

Opacidade

A opacidade dos filmes foi avaliada da mesma forma que na caracterização dos filmes, de acordo com o item 3.6.2.3.

3.11 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos no presente estudo foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Tukey utilizando o software STATISTICA 8 (Statsoft Inc., Tulsa, USA) com nível de confiança de 95 % ($p < 0.05$). Nos gráficos, as barras de erro representam o desvio padrão obtido.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a obtenção dos filmes a partir de diferentes formulações, bem como a caracterização dos mesmos. Os filmes foram preparados à base de soro de leite desmineralizado, proteína concentrada do soro de leite – WPC e proteína isolada do soro de leite – WPI. Além desses componentes foram adicionados gelatina como copolímero, glicerol como plastificante e aditivos como quitosana, nano-quitosana e óleo de semente de uva. Das formulações preparadas, apenas três foram selecionadas em função das suas características para a realização dos testes de vida de prateleira, envelhecimento acelerado, biodegradabilidade e teste em alimento.

4.1 Caracterização das matérias-primas

Os resultados da composição química do soro de leite, do WPC e do WPI são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Composição química do soro de leite, WPC e WPI em base úmida.

Materiais	Carboidratos (% bu)	Cinzas (% bu)	Lipídeos (% bu)	Proteínas (% bu)	Umidade (% bu)
Soro de leite	79,1 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	13,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1
WPC	4,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	86,2 ± 0,1	5,8 ± 0,1
WPI	2,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	90,0 ± 0,1	4,8 ± 0,1

*bu = base úmida

O soro do leite é composto majoritariamente por carboidratos e seu teor de proteínas está próximo ao relatado na literatura (15,6 %) (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011). Em comparação com os dados da literatura, o WPC apresentou valor superior no teor de proteínas (60-82 %) e inferior ao teor de carboidratos (lactose) (7-25 %) (JAMBRAK et al., 2014; KHANZADI et al., 2015; MUÑOZ et al., 2012; ROCHA et al., 2009). Por outro lado, o WPI apresentou valor inferior para o teor de proteínas (92-95 %) e superior para carboidratos (lactose) (0-1,08 %) (JAMBRAK et al., 2014; LI; CHEN, 2000; MODITSI et al., 2014; RAMOS et al., 2013; SEGAT et al., 2014; SILVA et al., 2016). O teor de proteínas irá impactar diretamente na capacidade de formação de filme, bem como a sua composição proteica (sem

ou com a presença de caseína). Além disso, a presença de impurezas e, principalmente, alto teor de carboidratos, interfere consideravelmente na capacidade de formação de filme.

As amostras de soro do leite, WPC e WPI foram analisadas qualitativamente, através de eletroforese, conforme diagrama apresentado na Figura 4.1. As amostras de soro de leite e WPC apresentaram três bandas principais em torno de 15, 20 e 70 kDa, que correspondem à presença de α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e albumina de soro bovina (BSA), respectivamente (LIU; ZHONG, 2013; WEN-QIONG; YI-HONG; YING, 2013). Para o WPI, as bandas principais foram em torno de 15 e 20 kDa. A proteína mais abundante no soro é a β -lactoglobulina, que representa 10 % da proteína total do leite ou aproximadamente 50 % da proteína do soro, possui uma massa molar de 18,362 kDa (YADA, 2004). É possível verificar que as amostras de soro de leite e WPC apresentam sinal forte para essa proteína, confirmando que a mesma é majoritária na composição dessas amostras. A segunda proteína mais abundante no soro é a α -lactoalbumina, que representa aproximadamente 2 % da proteína total do leite e 15 a 25 % da proteína total do soro, com uma massa molar de 14,1 kDa (YADA, 2004).

Pela análise do diagrama de eletroforese, observa-se que as amostras de soro e WPC possuem sinal fraco para essa proteína. O teor de α -lactoalbumina esperado para a composição de concentrados proteicos a partir da química de laticínios, é cerca de 1/3 do teor de β -lactoglobulina (BRYANT; JULIAN MCCLEMENTS, 1998). No entanto, para o WPI, observa-se sinal mais forte para a proteína α -lactoalbumina, o que pode indicar que esta é a proteína majoritária. A albumina do soro bovino (BSA) tem uma massa molar de 69 kDa (YADA, 2004), e seu sinal foi identificado na amostra. Também foram detectados, no soro e no WPC, sinais em outras faixas de massa molar, indicando a presença de outros componentes além de proteínas. Vale ressaltar que a presença desses componentes pode influenciar a capacidade de formação de película.

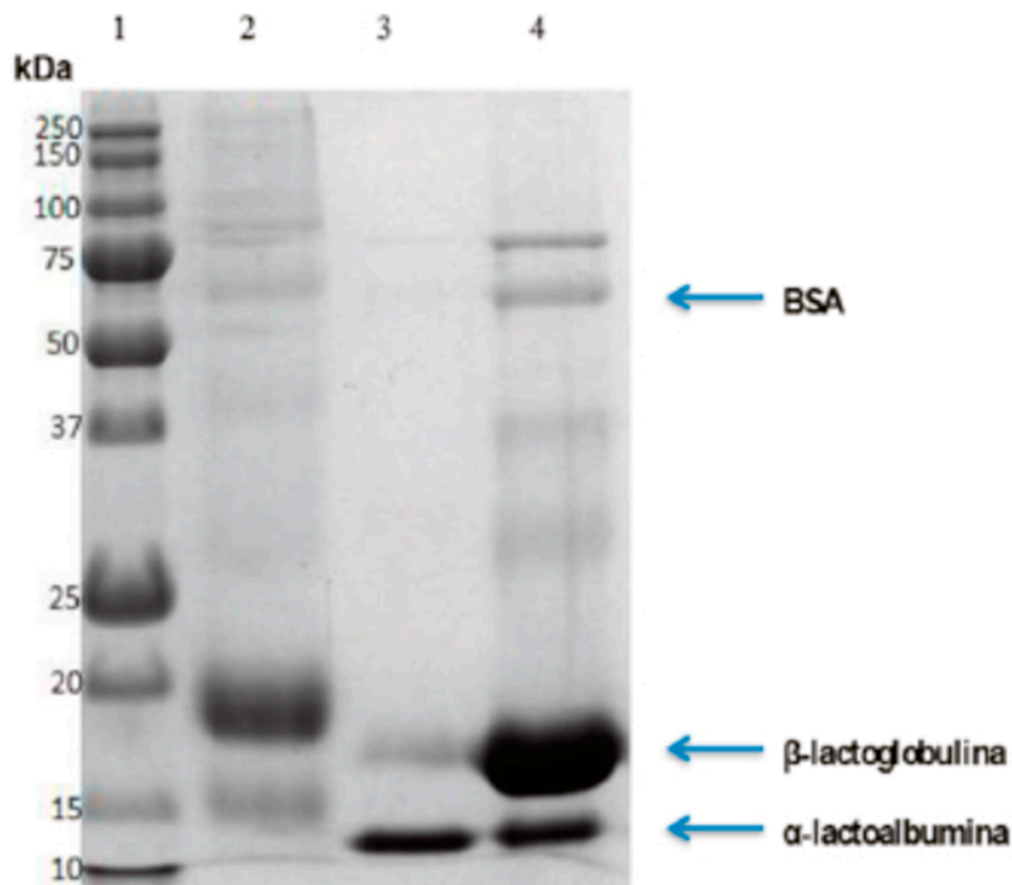


Figura 4.1 Fotografia dos géis de eletroforese SDS-PAGE. Legenda: (1) marcador de massa molar, (2) soro de leite desmineralizado, (3) WPI e (4) WPC.

Na Figura 4.2 estão apresentados os espectros de FT-IR das matérias-primas. Para a amostra de soro de leite (Figura 4.2 A), a presença dos grupos funcionais da lactose e das proteínas são confirmadas pelas bandas localizadas no intervalo de $1220-800\text{ cm}^{-1}$ e intervalo de $1700-1481\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (SOLÍS-OBA et al., 2011). Para a amostra de soro de leite (Figura 4.2 A), WPC (Figura 4.2 B) e WPI (Figura 4.3 C) é possível identificar três bandas intensas, em aproximadamente 3300 , 1600 e 1030 cm^{-1} , correspondentes às vibrações dos grupos amida I e amida II da proteína, respectivamente (JIA et al., 2016). Para carboidratos, existem sobreposições de bandas localizados na região de $1180-950\text{ cm}^{-1}$, as quais são resultantes de diferentes vibrações, tais como o alongamento de C-C e C-O e o modo de flexão de ligações C-H (WEN-QIONG; YI-HONG; YING, 2013). A presença de vibrações de grupos funcionais também foi observada: O-H ($\approx 3200\text{ cm}^{-1}$), C-H ($\approx 2900\text{ cm}^{-1}$), C=O ($\approx 1600\text{ cm}^{-1}$), CH₂ ($\approx 1490\text{ cm}^{-1}$) e C-O-C ($\approx 1000\text{ cm}^{-1}$) (ESCÁRCEGA-GALAZ et al., 2018).

A amostra de gelatina (Figura 4.2 D) apresentou as bandas características de amida I em 1654 cm^{-1} , proveniente do estiramento da carbonila; amida II em 1534 cm^{-1} , devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N; em 1496 cm^{-1} , devido ao estiramento

O-H (SIONKOWSKA et al., 2004). Para o espectro do glicerol (Figura 4.2 E), as bandas por volta de 1500 a 1000 cm^{-1} correspondem à vibração do grupo CH, as bandas de 985 cm^{-1} correspondem ao grupo C-O e os bandas de 918 cm^{-1} correspondem ao grupo OH, que representam a função de glicerol. Também é observada a presença do grupo hidroxila (3500 – 3000 cm^{-1}), ligação O=C-O (2929 cm^{-1}), ligação CH-O da função álcool (2877 cm^{-1}) e ligação C-O de álcool e ésteres (1200-1000 cm^{-1}) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Para o óleo de semente de uva (OSU) (Figura 4.2 F), as bandas principais de apareceram em 3365 cm^{-1} (O-H), 2915 e 2854 cm^{-1} (alongamento C-H), 1459 cm^{-1} (deformação antissimétrica CH_3), 1736 cm^{-1} (C = O) e 1158 cm^{-1} (estiramento antisimétrico C-O) (MA et al., 2012).

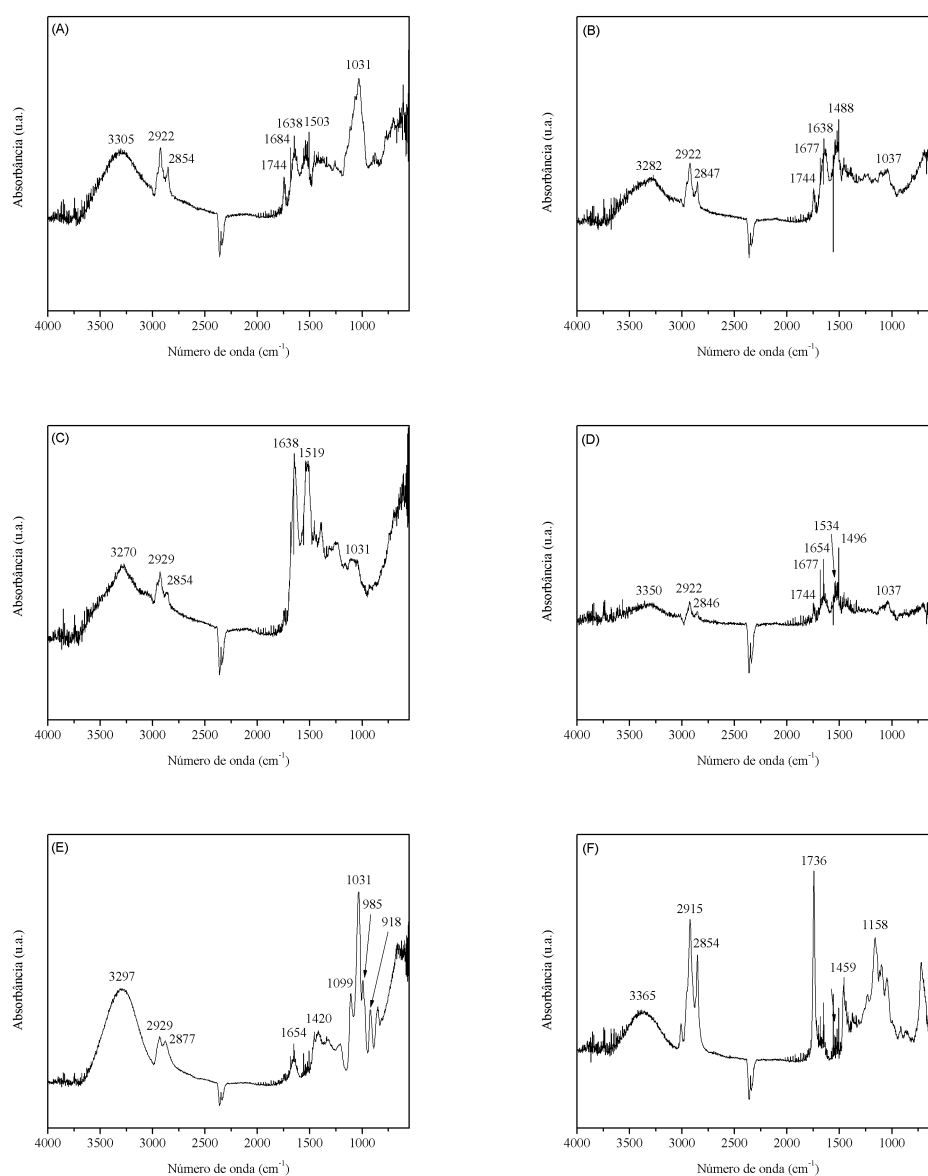


Figura 4.2 Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das amostras de (A) soro de leite, (B) WPC, (C) WPI, (D) gelatina, (E) glicerol e (F) OSU.

Os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), da temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo obtidos através das análises DSC e TGA de amostras de soro de leite, WPC, WPI, gelatina, glicerol e OSU são apresentados na Tabela 4.2. Para todas as amostras houve a ocorrência de apenas uma T_g , não sendo detectados bandas relacionadas com a fusão ou a cristalização na faixa de temperatura avaliada (25 °C a 110 °C), o que sugere que as amostras se encontram no estado amorfo ou que degradaram antes de fundir. Vale ressaltar que durante o processamento essas temperaturas (T_d e T_{max}) não serão alcançadas, evitando problemas associados à degradação térmica dos componentes.

Tabela 4.2 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) do soro de leite, WPC, WPI, gelatina, glicerol e óleo de semente de uva.

Amostra	T_g (°C)	T_d (°C)	T_{max} (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%) _{800 °C}
Soro	32,8	204,1	250,8	59,5	26,2
WPC	33,2	292,1	326,1	57,9	20,0
WPI	33,3	302,6	347,9	37,0	21,5
Gelatina	31,1	295,6	330,4	48,4	22,4
Glicerol	33,5	260,7	272,6	86,3	0,1
OSU	34,1	378,1	412,6	90,6	8,7

Como a degradação das amostras ocorreu em temperaturas superiores a 200 °C com T_{max} próximas de 300 °C, conclui-se que os materiais são estáveis termicamente. Como se pode observar, os valores de porcentagem de perda de massa para o soro, WPC, WPI e gelatina são próximos entre si e próximos a 20 %. Já para o glicerol e OSU os valores são inferiores (0,1 e 8,7 %, respectivamente), o que reflete a maior degradação desses materiais. Esses resultados podem estar relacionados à pureza e composição da amostra.

As curvas de TGA do soro de leite, WPC, WPI, da gelatina, do glicerol e do OSU estão apresentados na Figura 4.3.

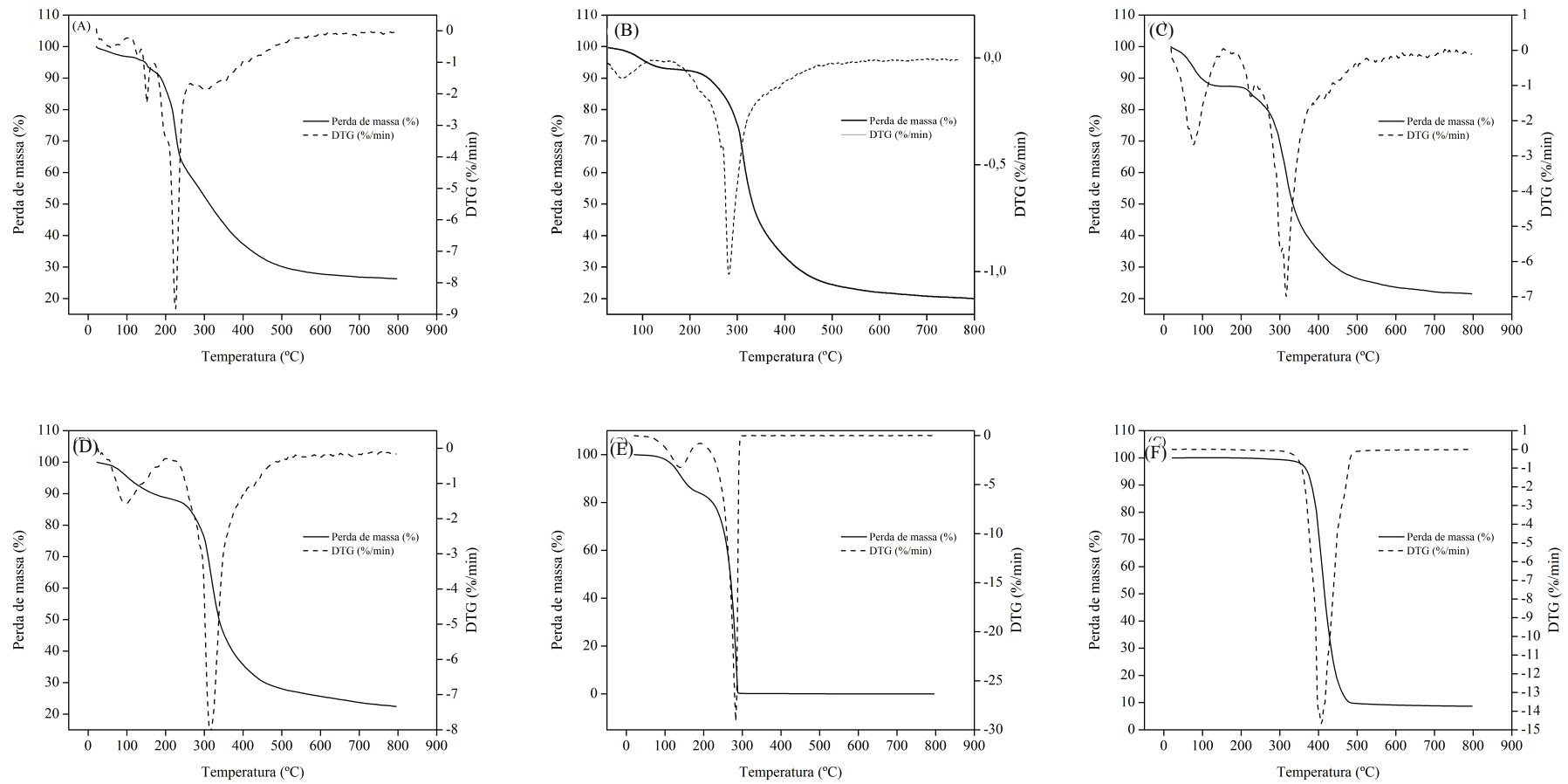


Figura 4.3 Curvas de TGA e de DTG das amostras de (A) soro do leite, (B) WPC, (C) WPI, (D) gelatina, (E) glicerol e (F) OSU.

O soro do leite e o WPI revelaram a presença de três etapas de degradação térmica. A primeira etapa está associada à perda de umidade do material, até aproximadamente 200 °C. A segunda etapa está relacionada à decomposição de polissacarídeos. A terceira etapa está relacionada à decomposição do material (proteínas) (KANMANI; RHIM, 2014; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). O WPC, a gelatina e o glicerol revelaram a presença de duas etapas de degradação térmica. A primeira etapa está associada à perda de umidade do material, até aproximadamente a T_d do material. A segunda etapa está relacionada à decomposição do material. O OSU exibiu estabilidade mássica até a temperatura de 378 °C e, após essa temperatura, houve decomposição/volatização completa do óleo em uma única fase, indicando que a amostra não apresenta outros componentes. O glicerol é completamente decomposto e o soro apresenta a maior massa residual seguido da gelatina, o que pode estar relacionado com a pureza do material.

4.2 Viscosidade das soluções filmogênicas

A viscosidade desempenha um papel importante na formação de filmes, uma vez que contribui grandemente para a estabilização da dispersão, o que pode implicar em uma maior homogeneidade da estrutura do filme (MORENO et al., 2014). Pode também ter impacto na espalhabilidade e uniformidade do filme, o que afeta o desempenho e a espessura do filme resultante (ZHONG; CAVENDER; ZHAO, 2014). Na Tabela 4.3 estão apresentados os dados de viscosidade das soluções filmogênicas à base de soro de leite que resultaram em filmes. A viscosidade não foi afetada pelo teor de glicerol nem pela adição de quitosana e de nano-quitosana. Os valores obtidos são superiores a uma solução de 7 % (m/m) de isolado proteico de soro de leite que possui viscosidade de $2,18 \pm 0,31$ mPa s (RYAN et al., 2012). Apesar de o valor encontrado ser superior, ele ainda é considerado baixo, o que proporciona vantagem para o processamento do filme.

Tabela 4.3 Viscosidade de diferentes formulações de filmes à base de soro de leite e gelatina.

Filme	Viscosidade (mPa s)
S3G10Gel3	$6,0 \pm 1,5^a$
S3G10Gel3N30	$4,7 \pm 0,1^{a,b}$
S3G10Gel3Q30	$5,3 \pm 0,2^{a,b}$
S3G20Gel3	$4,6 \pm 0,1^{a,b}$
S3G20Gel3N30	$4,6 \pm 0,1^b$
S3G20Gel3Q30	$4,5 \pm 0,2^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

S = soro de leite; G = glicerol; Gel = gelatina; Q = quitosana; N = nano-quitosana.

Para as formulações à base de proteína concentrada de soro de leite, a viscosidade se manteve constante para as diferentes formulações (Tabela 4.4) e foram próximas de 66 mPa s. Wang, Liu, Holmes, Kerry & Kerry (2007), reportaram que a viscosidade de soluções de caseinato de sódio (4 % e 8 %), WPI (8 % e 12 %), gelatina (4 % e 8 %), carboximetilcelulose (2 % e 3 %), alginato de sódio (1 % e 1,5 %) e amido de batata (2 % e 3 %) necessárias para gerar filmes estáveis apresentaram valores dentro do intervalo de 11-668 mPa s, sendo que as soluções fora desta faixa de viscosidade foram rejeitadas devido à incapacidade para formar películas estáveis. Isso é decorrente da dificuldade de dispersar os ingredientes e eliminar bolhas de ar visíveis em filmes em função da elevada viscosidade. Ryan, Zhong & Foegeding (2013), para a caracterização das propriedades físico-químicas dos agregados solúveis formados por diferentes proteínas do soro do leite, relataram que uma solução de WPI (10%) desnaturada possui uma viscosidade aparente de 175 mPa s. Vale ressaltar que a viscosidade apresentada pelas diferentes formulações à base de soro de leite do presente trabalho foi adequada para a formação de filmes estáveis.

Tabela 4.4 Viscosidade de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina.

Filme	Viscosidade (mPa s)
C3G30Gel3	66 ± 10,1 ^a
C3G30Gel3N	67 ± 0,2 ^a
C3G30Gel3Q	66 ± 0,5 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).
C = proteína concentrada do soro de leite; G = glicerol; Gel = gelatina; Q = quitosana; N = nano-
quitosana.

Os valores de viscosidade para as diferentes formulações dos filmes à base de proteína isolada do soro de leite e óleo de semente de uva estão mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Viscosidade de diferentes formulações de filmes à base de WPI, glicerol e OSU.

Filme	Viscosidade (mPa s)
I10G50	4,7 ± 0,1 ^c
I10G50UV1	4,6 ± 0,2 ^c
I10G50UV10	7,2 ± 0,1 ^{a,b}
I10G50UV20	7,4 ± 1,2 ^{a,b}
I10G50UV40	6,9 ± 2,2 ^{a,b}
I10G70	4,7 ± 0,2 ^c
I10G70UV10	8,1 ± 0,1 ^{a,b}
I10G70UV20	6,2 ± 0,3 ^b
I10G70UV40	8,3 ± 0,8 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).
I = proteína isolada do soro de leite; G = glicerol; Gel = gelatina; Q = quitosana; N = nano-
quitosana.

Foi observado um aumento na viscosidade das formulações testadas contendo mais que 1 % de óleo.

Para as formulações à base de soro de leite desmineralizado e gelatina, as que formaram filme são apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Composição de WP, glicerol, gelatina e aditivos (quitosana, nano-quitosana) das diferentes formulações de filmes à base de soro de leite que formaram filmes.

Número da formulação	% S m/V	% G mss*	% Gel m/V	% Q mss*	% N mss*	Nomenclatura
1	3	30	3	0	0	S3G30Gel3
2	3	30	2	0	0	S3G30Gel2
3	3	30	1	0	0	S3G30Gel1
4	3	20	3	0	0	S3G20Gel3
5	3	20	2	0	0	S3G20Gel2
6	3	20	1	0	0	S3G20Gel1
7	3	10	3	0	0	S3G10Gel3
8	3	10	2	0	0	S3G10Gel2
9	3	10	1	0	0	S3G10Gel1
10	3	20	3	0,3	0	S3G20Gel3Q
11	3	20	3	0	0,3	S3G20Gel3N
12	3	10	3	0,3	0	S3G10Gel3Q
13	3	10	3	0	0,3	S3G10Gel3N

*mss (massa/massa seca de soro de leite); S = soro de leite; G = glicerol; Gel = gelatina; Q = quitosana; N = nano-quitosana.

Para as formulações à base de proteína concentrada do soro de leite, as que formaram filme são apresentadas na Tabela 4.7. O número de formulações que resultaram em filmes para o WPC foi inferior ao obtido pelo WPI e WP, provavelmente em decorrência da presença de caseína na sua composição (formação de coalho durante o processo de desnaturação da proteína). Também se verificou que as suas propriedades foram não foram satisfatórias, decidiu-se, então, não utilizar os filmes à base de WPC para todas as etapas do trabalho. Os resultados da caracterização dos filmes à base de WPC estão apresentados no Apêndice A.

Tabela 4.7 Composição de WPC, glicerol, gelatina e aditivos (quitosana, nano-quitosana) das diferentes formulações à base proteína concentrada de soro de leite que formaram filmes.

Número da formulação	% C mV	% G m/mss	% Gel m/V	% Q mss*	% N mss*	Nomenclatura
1	3	30	3	0	0	C3G30Gel3
2	3	30	3	0,3	0	C3G30Gel3Q
3	3	30	3	0	0,3	C3G30Gel3N

* mss (massa/massa seca de WPC); C = proteína concentrada do soro de leite; G = glicerol; Gel = gelatina; Q = quitosana; N = nano-quitosana.

Para as formulações à base de proteína isolada do soro de leite, as que formaram filme são apresentadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 Composição de WPI, glicerol e óleo de semente de uva das diferentes formulações à base proteína isolada de soro de leite que formaram filmes.

Número da formulação	% I m/V	% G mss*	% UV mss*	Nomenclatura
1	10	30	0	I10G30
2	10	50	0	I10G50
3	10	70	0	I10G70
4	10	30	1	I10G30UV1
5	10	30	10	I10G30UV10
6	10	30	20	I10G30UV20
7	10	30	40	I10G30UV40
8	10	30	1	I10G50UV1
9	10	50	10	I10G50UV10
10	10	50	20	I10G50UV20
11	10	50	40	I10G50UV40
12	10	70	1	I10G70UV1
13	10	70	10	I10G70UV10
14	10	70	20	I10G70UV20
15	10	70	40	I10G70UV40

* mss (massa/massa seca de soro de leite); I = proteína isolada do soro de leite; G = glicerol; UV = óleo de semente de uva.

4.3 Propriedades dos filmes

A seguir serão apresentados os resultados de caracterização dos filmes à base de soro de leite e gelatina e dos filmes à base de proteína isolada do soro de leite em relação às propriedades mecânicas, físicas, morfológicas, químicas, de barreira e térmicas. Ao final, foi selecionada a melhor formulação, com base em suas propriedades para aplicação como embalagem de alimentos. Os resultados de caracterização das propriedades dos filmes à base de proteína concentrada do soro do leite estão apresentados no Apêndice A.

4.3.1 Caracterização dos filmes

Em relação aos filmes à base de soro de leite e gelatina, as formulações contendo 30 % de glicerol (S3G30Gel3, S3G30Gel2 e S3G30Gel1) formaram filme, porém as películas obtidas ficaram bastante frágeis, com elevada umidade e aspecto gelatinoso, impossibilitando, desta forma, o preparo de amostras para posterior caracterização. Em filmes fabricados a partir de soro de leite, os níveis crescentes de glicerol aumentam a extensibilidade e reduzem a resistência do filme (MCHUGH; AUJARD; KROCHTA, 1994). Quanto maior o teor de glicerol, maior o teor de umidade. Além disso, o efeito plastificante da água reduz as interações proteína-proteína, favorece a mobilidade das cadeias do polímero, aumenta o volume livre e como resultado, aumenta a difusão de umidade (KOKOSZKA et al., 2010b). As demais formulações (S3G20Gel3, S3G20Gel2, S3G20Gel1, S3G10Gel3, S3G10Gel2, S3G10Gel1, S3G20Gel3Q, S3G20Gel3N, S3G10Gel3Q e S3G10Gel3N) formaram filmes estáveis e fáceis

de manusear, sendo os mesmos caracterizados quanto às propriedades: mecânicas, físicas, morfológicas, composição química, de barreira e térmicas.

As caracterizações quanto às propriedades mecânicas, físicas, morfológicas, químicas, de barreira e térmicas dos filmes à base de WPI foram realizadas para as seguintes formulações: I10G30, 10G50, I10G50UV1, I10G50UV10, I10G50UV20, I10G50UV40, I10G70, I10G70UV10, I10G70UV20 e I10G70UV40. Para as amostras contendo 30 % de glicerol (m/m seca de WPI) e com diferentes concentrações de óleo de semente de uva houve a formação de película, porém a mesma se apresentou extremamente quebradiça, impossibilitando sua manipulação e posterior caracterização. A fragilidade apresentada pela formulação é provavelmente decorrente da baixa concentração de glicerol.

4.3.1.1 Propriedades mecânicas

Na Tabela 4.9 estão apresentados os valores do módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ϵ_b) e tensão na ruptura (σ_b) dos filmes à base de soro de leite e gelatina obtidos.

Tabela 4.9 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ϵ_b) e tensão na ruptura (σ_b) de diferentes formulações de filmes à base de soro de leite e gelatina com e sem adição de quitosana e nano-quitosana. Espessura média: $69,3 \pm 7,5 \mu\text{m}$.

Filme	Módulo de Young (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Tensão na ruptura (MPa)
S3G20Gel1	$0,7 \pm 0,0^e$	$21,3 \pm 1,6^b$	$0,5 \pm 0,3^f$
S3G20Gel2	$1,3 \pm 0,1^e$	$45,1 \pm 5,1^a$	$0,9 \pm 0,6^f$
S3G20Gel3	$17,1 \pm 2,3^b$	$4,2 \pm 0,7^{e,f}$	$15,0 \pm 3,0^{c,d}$
S3G10Gel1	$19,2 \pm 1,0^{a,b}$	$1,7 \pm 0,1^{e,f}$	$11,8 \pm 1,5^d$
S3G10Gel2	$15,5 \pm 0,9^{b,c}$	$6,2 \pm 2,2^{e,f}$	$16,9 \pm 2,5^c$
S3G10Gel3	$18,6 \pm 0,2^{a,b}$	$15,3 \pm 2,4^{b,c}$	$23,1 \pm 2,6^b$
S3G20Gel3Q	$7,5 \pm 3,0^d$	$6,6 \pm 1,2^{e,f}$	$5,9 \pm 0,9^e$
S3G20Gel3N	$12,6 \pm 0,1^c$	$8,6 \pm 0,6^{d,e,f}$	$10,1 \pm 0,3^{d,e}$
S3G10Gel3Q	$12,4 \pm 1,6^c$	$12,7 \pm 0,6^{c,d,e}$	$14,3 \pm 1,1^{c,d}$
S3G10Gel3N	$21,4 \pm 0,9^a$	$3,3 \pm 0,9^{e,f}$	$28,1 \pm 1,7^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

É possível verificar que o aumento da concentração de glicerol acarreta uma diminuição da tensão e do módulo de Young, o que conduz a filmes mais flexíveis, enquanto há aumento da elongação (MCHUGH; KROCHTA, 1994b). Para as formulações contendo 20 % de glicerol e 3 g de gelatina, há aumento do E e da σ_b e diminuição de ϵ_b , em relação aos filmes com menor concentração de gelatina e mesmo teor de glicerol. Já para as formulações contendo 10 % de glicerol, o aumento do teor de gelatina não interfere no E , porém ocasiona aumento no σ_b e ϵ_b . Jiang e colaboradores (2010) avaliaram a relação entre as propriedades microestruturais e

físicas de filmes compósitos de WPI e gelatina. Na proporção em massa de 50W:50Gel, em decorrência dos efeitos eletrostáticos, o WPI e as partículas de gelatina formaram agregados compactos em solução, onde foi observado um notável encolhimento das partículas de gelatina. Esse efeito pode estar relacionado à diminuição da elongação e aumento da tensão na ruptura com o aumento da quantidade de gelatina.

A incorporação de quitosana ocasionou uma redução no E e σ_b , porém não houve alteração no ε_b , em ambas concentrações de glicerol. A nano-quitosana apresenta um comportamento variado em função da concentração de glicerol, mas há alteração das propriedades mecânicas. A incorporação de aditivos antimicrobianos pode alterar as propriedades mecânicas dos filmes (OZDEMIR; FLOROS, 2008a).

Na literatura, valores próximos aos obtidos nesse trabalho (módulo de Young, alongamento na ruptura e tensão na ruptura) foram reportados por Wang, Auty, & Kerry (2010) ao avaliarem as propriedades de filmes compósitos à base de WPI, gelatina e alginato de sódio. Alguns autores alcançaram valores superiores de alongamento na ruptura (ε_b), porém com valores inferiores para a tensão de ruptura (σ_b) (KAEWPRACHU et al., 2016; OZDEMIR; FLOROS, 2008a). Outros autores obtiveram valores inferiores de alongamento na ruptura (ε_b) e tensão de ruptura (σ_b) (OSÉS et al., 2009; SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011). Em comparação com filmes sintéticos, Osés et al. (2009) apresentaram valores de ε_b de 254 % e σ_b de $44,9 \pm 2,65$ MPa para amostras de PVC com espessura de $0,010 \pm 0,001$ mm e Balzer, Vicente, Briesemeister, & Becker (2007), para PVC rígido, obtiveram ε_b de $21,9 \pm 1,3$ % e σ_b de $50,71 \pm 0,95$ MPa. A partir desses resultados, pode-se sugerir que os filmes à base de soro de leite são mais frágeis que o PVC.

A diferença dos valores apresentados é decorrente principalmente de diferentes formulações, isto é, das características dos componentes e da sinergia entre os diferentes compostos utilizados. Uma vez que os resultados obtidos para os filmes contendo 3 g de gelatina apresentaram melhores propriedades mecânicas que os demais filmes preparados, os outros ensaios de caracterizações foram realizados somente para esses filmes (S3G20Gel3, S3G10Gel3, S3G20Gel3Q, S3G20Gel3N, S3G10Gel3Q e S3G10Gel3N).

Na Tabela 4.10 estão apresentados os valores do módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ε_b) e tensão na ruptura (σ_b) dos filmes à base de WPI. Em relação ao teor de glicerol, foi observado um aumento de ε_b e diminuição do E com o aumento do teor de glicerol, porém a σ_b permaneceu aproximadamente constante. Barreto, Pires & Soldi (2003) relataram que o aumento do teor de glicerol aumenta a elasticidade e alongamento dos filmes, pois o glicerol

restringe o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre as cadeias de proteínas, aumentando, assim, o espaçamento intermolecular e, por conseguinte, a mobilidade da cadeia. As demais caracterizações para o filme I10G30 não foram realizadas, uma vez que esta formulação apresentou propriedades mecânicas inferiores às demais e a incorporação de OSU resultou em filmes frágeis e quebradiços.

Tabela 4.10 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ε_b) e tensão na ruptura (σ_b) dos filmes à base de WPI para diferentes formulações. Espessura média: $216 \pm 28 \mu\text{m}$.

Filme	Módulo de Young (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Tensão de ruptura (MPa)
I10G30	$2,1 \pm 0,2^{a,b}$	$37,6 \pm 2,4^{b,c}$	$0,33 \pm 0,01^{b,c,d}$
I10G50	$0,22 \pm 0,01^c$	$46,3 \pm 13,5^b$	$0,49 \pm 0,19^b$
I10G50UV1	$2,5 \pm 0,1^a$	$11,6 \pm 0,9^{e,f}$	$0,93 \pm 0,10^a$
I10G50UV10	$1,7 \pm 0,6^b$	$13,6 \pm 1,3^{d,e}$	$0,86 \pm 0,05^a$
I10G50UV20	$0,62 \pm 0,07^c$	$23,9 \pm 6,1^{c,d}$	$0,12 \pm 0,07^{c,d,e}$
I10G50UV40	$0,33 \pm 0,06^c$	$5,2 \pm 0,9^f$	$0,10 \pm 0,03^{d,e}$
I10G70	$0,08 \pm 0,01^c$	$116,3 \pm 9,6^a$	$0,35 \pm 0,01^{b,c}$
I10G70UV10	$0,11 \pm 0,01^c$	$26,6 \pm 6,8^{c,d,e}$	$0,33 \pm 0,11^{b,c,e}$
I10G70UV20	$0,13 \pm 0,026^c$	$32,2 \pm 1,8^{b,c}$	$0,10 \pm 0,02^{d,e}$
I10G70UV40	$0,09 \pm 0,02^c$	$25,9 \pm 2,3^{c,d}$	$0,06 \pm 0,02^{d,e}$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Pode-se observar também (Tabela 4.10) que a adição de 1 % e 10 % de OSU aumentou significativamente a resistência à tração dos filmes para as formulações contendo 50 % de glicerol. No entanto, o contrário ocorre para os filmes contendo 20 % e 40 % de OSU, que apresentaram uma redução de σ_b . Quanto maior o teor de óleo, mais baixa é a resistência à tração. Isto pode ser explicado pelo efeito plastificante do OSU em quantidades mais elevadas, uma vez que há uma tendência de aumento do alongamento na ruptura. Esse resultado também sugere que a incorporação de uma quantidade baixa de lipídeos na matriz da proteína de soro de leite conduz a uma estrutura mais compacta (GALUS; KADZIŃSKA, 2016a). A mesma tendência pode ser observada para os valores de E : valores mais elevados quando o OSU foi adicionado a 1 % e 10 % e inferiores a 20 % e 40 %. O mesmo comportamento foi relatado no trabalho de Galus & Kadzińska (2016b) no qual uma menor concentração de óleo de amêndoa (0,5 %) ocasionou um aumento na resistência à tração e no módulo de Young de filmes à base de WPI (8 % m/m) e glicerol (50 % m/m). Porém, para uma maior concentração (1 %), o comportamento foi o oposto. Quanto maior o teor de óleo, menores os valores obtidos de resistência à tração. Isso pode ser explicado pelo efeito plastificante do óleo de amêndoa em quantidades maiores nos filmes. Bahram et al. (2014) verificaram que a incorporação de óleo

essencial de cinamomo em filmes à base de WPC (8 % m/v) e glicerol (razão 1:1 de WPC:glicerol) ocasionou uma redução significativa ($p < 0,05$) no valor de σ_b . Essa diminuição pode ser atribuída à incorporação de compostos oleosos, induzindo uma estrutura heterogênea.

4.3.1.2 Propriedades físicas

Os resultados de espessura para os diferentes filmes à base de soro de leite e gelatina obtidos estão apresentados na Tabela 4.11. Em relação à espessura dos filmes à base de soro de leite, o teor de glicerol e a adição de quitosana não ocasionaram alterações, porém a incorporação da nano-quitosana acarretou um aumento da espessura. A gramatura se manteve constante para as diferentes formulações, não houve relação entre a espessura encontrada com a gramatura. Henrique, Cereda, & Sarmiento (2008) obtiveram uma gramatura de $45,789 \pm 0,851 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-2}$ em filmes à base de amido de mandioca modificado e $4,095 \pm 0,007 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-2}$ para o PVC comercial.

Os filmes à base de soro e gelatina apresentaram valores de opacidade inferiores aos valores da literatura ($1,89\text{-}3,12 \text{ A}_{600} \text{ mm}^{-1}$) (LIU et al., 2017b; MOHAJER; REZAEI; HOSSEINI, 2017). Os filmes contendo quitosana apresentaram os valores mais baixos para a opacidade. Esse resultado pode estar relacionado à opacidade da matriz do filme, onde o espaçamento entre as cadeias do polímero foi diminuído e também a uma distribuição não uniforme de componentes do filme, permitindo que mais luz passe pelo filme (YANG; PAULSON; NICKERSON, 2010). A contração na estrutura pode ser evidenciada pela diminuição da espessura dos filmes adicionados com quitosana. Os filmes obtidos neste trabalho podem proporcionar propriedades de barreira à luz adequadas, dependendo da sua aplicação em produtos alimentares.

Tabela 4.11 Espessura, gramatura e opacidade de filmes à base de soro de leite e gelatina preparados com diferentes formulações.

Filme	Espessura (μm)	Gramatura (g/cm^2) $\times 10^3$	Opacidade (A/mm)
S3G10Gel3	$67,1 \pm 7,2^{b,c}$	$7,6 \pm 0,5^a$	$1,32 \pm 0,02^a$
S3G10Gel3N	$80,6 \pm 8,3^a$	$8,0 \pm 0,5^a$	$1,24 \pm 0,06^a$
S3G10Gel3Q	$61,1 \pm 6,9^c$	$8,1 \pm 0,8^a$	$0,97 \pm 0,02^b$
S3G20Gel3	$68,7 \pm 6,6^{b,c}$	$7,5 \pm 0,5^a$	$1,29 \pm 0,02^a$
S3G20Gel3N	$75,6 \pm 10,3^{a,b}$	$7,2 \pm 0,7^a$	$1,27 \pm 0,04^a$
S3G20Gel3Q	$62,8 \pm 8,0^c$	$8,4 \pm 1,2^a$	$0,94 \pm 0,02^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

As espessuras obtidas para os diferentes filmes à base de WPI estão apresentadas na Tabela 4.12. A incorporação do OSU resultou em uma tendência de aumento na espessura dos

filmes. Na verdade, a mesma massa de solução filmogênica foi utilizada, porém a matéria seca das soluções aumenta com a incorporação de aditivos. Alguns autores também relataram aumento da espessura com a incorporação de aditivos (KADAM et al., 2013; OYMACI; ALTINKAYA, 2016; SHANKAR et al., 2015).

A gramatura (Tabela 4.12) se manteve praticamente constante para as diferentes formulações e foi próxima a $26,0 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-2}$. Os filmes à base de proteína isolada do soro de leite apresentaram valores de opacidade baixos (Tabela 4.12), em comparação com dados da literatura (GALUS et al., 2013; GALUS; KADZIŃSKA, 2016b, 2016a; LEE; YANG; SONG, 2016; LIU et al., 2017b; MOHAJER; REZAEI; HOSSEINI, 2017). A opacidade dos filmes à base de WPI aumentou ligeiramente quando a concentração de OSU aumentou, para os filmes contendo 70 % de glicerol a partir de uma concentração de 20 % de OSU, provavelmente devido à maior opacidade do OSU. A relação entre a opacidade dos filmes com o teor de lipídeos tem sido amplamente divulgada na literatura (GALUS; KADZIŃSKA, 2016a, 2016b; MA et al., 2012; PEREDA; AMICA; MARCOVICH, 2012; PEREDA; ARANGUREN; MARCOVICH S, 2010; SHAW et al., 2002; XIAO et al., 2016; YANG; PAULSON; NICKERSON, 2010).

Tabela 4.12 Espessura, gramatura e opacidade de filmes à base de WPI preparados com diferentes formulações.

Filme	Espessura (μm)	Gramatura (g/cm^2) $\times 10^3$	Opacidade (A/mm)
I10G50	171 ± 3^d	$23,8 \pm 0,9^{a,b}$	$0,20 \pm 0,02^c$
I10G50UV1	$202 \pm 4^{c,d}$	$20,3 \pm 3,4^b$	$0,22 \pm 0,01^{b,c}$
I10G50UV10	$219 \pm 4^{a,b,c,d}$	$25,4 \pm 1,1^{a,b}$	$0,22 \pm 0,04^{b,c}$
I10G50UV20	$206 \pm 4^{b,c,d}$	$23,9 \pm 3,5^{a,b}$	$0,21 \pm 0,06^{b,c}$
I10G50UV40	$257 \pm 3^{a,b}$	$27,1 \pm 1,3^{a,b}$	$0,21 \pm 0,02^{b,c}$
I10G70	$201 \pm 3^{c,d}$	$25,6 \pm 0,9^{a,b}$	$0,23 \pm 0,02^{b,c}$
I10G70UV10	259 ± 6^a	$28,2 \pm 4,7^{a,b}$	$0,27 \pm 0,06^{b,c}$
I10G70UV20	$224 \pm 6^{a,b,c}$	$29,5 \pm 4,8^a$	$0,38 \pm 0,08^a$
I10G70UV40	$202 \pm 5^{c,d}$	$31,2 \pm 2,5^a$	$0,42 \pm 0,07^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A solubilidade em água é uma propriedade importante para filmes com aplicação em embalagens de alimentos. Dependendo da finalidade, a embalagem pode exigir insolubilidade em água para melhorar a integridade do produto, ou quando os filmes estão em contato com a água durante o processamento e armazenamento. Para algumas aplicações, a solubilidade em água dos filmes pode ser útil para o encapsulamento de alimentos ou aditivos secos e para reduzir os problemas ambientais ocasionados por filmes não-biodegradáveis (KAEWPRACHU

et al., 2016). Valores de solubilidade em água dos filmes à base de soro de leite e gelatina, para diferentes formulações, estão apresentados na Tabela 4.13. Com o aumento da concentração de glicerol, há um aumento na solubilidade em água, em função da higroscopicidade do glicerol (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). A adição de quitosana ou de nano-quitosana não ocasionou alterações na solubilidade, provavelmente em função da baixa concentração. Além disso, vale ressaltar que a quitosana é insolúvel em água ou em solventes orgânicos. No entanto, em ácidos orgânicos diluídos, como ácido acético, ácido fórmico e ácidos inorgânicos, os grupos amino livres são protonados e o biopolímero se torna totalmente solúvel (RENAULT et al., 2009). Para todas as formulações, a integridade dos filmes foi mantida após 24 h de imersão em água. Quanto à umidade (Tabela 4.13), não houve variações com o aumento do teor de glicerol, nem com a adição de quitosana ou de nano-quitosana.

Tabela 4.13 Solubilidade em água, solubilidade em etanol e umidade para filmes à base de soro de leite e gelatina preparados com diferentes formulações.

Filme	Solubilidade em água (%)	Solubilidade em etanol (%)	Umidade (%)
S3G10Gel3	57,5 ± 1,0 ^c	5,6 ± 1,4 ^b	21,4 ± 1,4 ^{a,b}
S3G10Gel3N	58,9 ± 1,1 ^{b,c}	8,3 ± 0,3 ^{b,c}	18,8 ± 2,5 ^b
S3G10Gel3Q	57,3 ± 0,5 ^c	5,2 ± 0,7 ^b	20,6 ± 2,3 ^b
S3G20Gel3	62,0 ± 1,8 ^a	15,8 ± 0,6 ^a	23,1 ± 2,2 ^{a,b}
S3G20Gel3N	60,4 ± 0,4 ^{a,b}	13,2 ± 0,2 ^{a,c}	23,8 ± 1,1 ^{a,b}
S3G20Gel3Q	58,4 ± 0,2 ^{b,c}	14,8 ± 3,0 ^a	27,2 ± 3,0 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em comparação com os dados da literatura, os valores obtidos de solubilidade são superiores aos dos filmes à base de WPI e WPC, porém inferiores aos de gelatina. Gounga et al. (2010), para filmes à base de WPI (7 % m/v) e glicerol (razão WPI:glicerol de 3,6:1), obtiveram valores de solubilidade em água de 50,6 ± 4,8 % e umidade de 16,5 ± 1,5 %. Pérez, Piccirilli, Delorenzi, & Verdini (2016) obtiveram valores de solubilidade em água de 41,1 ± 2,8 % e de umidade de 27,9 ± 2,8 % para filmes à base de WPC (8% m/m) e glicerol (8 % m/m). Ozdemir & Floros (2008b), para filmes à base de WPI (50 % m/m) e sorbitol (50 % m/m), alcançaram solubilidade em água de 48,24 %. Kaewprachu et al. (2016), reportaram valores de solubilidade em água de 71,80 ± 1,7 % para filmes à base de gelatina bovina (7 % m/v) e glicerol (50 % m/m baseado no teor de proteína), de 16,2 ± 1,2 % para filmes à base de WPC (7 % m/v) e glicerol (50 % m/m baseado no teor de proteína), sendo o PVC considerado insolúvel em água. Um dos motivos para a baixa solubilidade de filmes à base de WPI e WPC é a baixa solubilidade em água das proteínas do soro de leite, em função das fortes ligações intermoleculares obtidas durante o processo de desnaturação (RAMOS et al., 2013). Apesar dos filmes obtidos nesse

trabalho também conterem proteínas do soro do leite, sua concentração é relativamente inferior (aproximadamente 13 %), uma vez que se trata do soro bruto (não passou pelo processo de purificação das proteínas), o que diminui a parcela insolúvel do filme. Além disso, a gelatina apresenta elevada solubilidade em água. Na literatura já foi relatado que o aumento de gelatina na composição de filmes à base de amido aumenta a solubilidade dos filmes (FAKHOURI et al., 2015).

O estudo da solubilidade dos filmes em etanol (Tabela 4.13) tem por finalidade avaliar a solubilidade dos mesmos em solventes polares. Assim como em água, os filmes se mantiveram íntegros após 24 h imersos em etanol. O aumento da concentração de glicerol acarretou aumento da solubilidade em etanol, em função da interação do glicerol com solventes polares (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014), e a adição de quitosana ou nano-quitosana não interferiu neste parâmetro. Apesar de uma elevada solubilidade em água, os filmes apresentaram baixa solubilidade em etanol.

Valores de solubilidade em água dos filmes à base de WPI estão apresentados na Tabela 4.14. Observa-se que houve uma diminuição da solubilidade em água com a incorporação de OSU nas concentrações de 1 % e 10 %. Uma maior solubilidade para filmes contendo maiores concentrações de OSU pode estar relacionado com alterações na estrutura do filme (BAHRAM et al., 2016). Para todas as formulações, a integridade dos filmes foi mantida após 24 h de imersão em água. Bahram et al. (2014) investigaram a incorporação de óleo de cinamomo em filmes à base de WPI e observaram uma redução significativa na solubilidade em água para os filmes com óleo em comparação aos sem a adição de óleo. O mesmo comportamento foi relatado por Ozdemir & Floros (2008) que verificaram que a incorporação de cera de abelha em filmes à base de WPI possui um efeito negativo para a solubilidade, ou seja, diminui este parâmetro. Para a umidade (Tabela 4.14), houve uma pequena redução com a incorporação de OSU nas concentrações de 1 % e 10 %. Khanzadi et al. (2015), para filmes à base de WPC e pululan, verificaram que a umidade é dependente da concentração de cera de abelha incorporada.

Assim como em água, os filmes se mantiveram íntegros após 24 h imersos em etanol. Vale ressaltar que quanto maior a concentração de OSU, maior a solubilidade em etanol, uma vez que o OSU é apolar.

Tabela 4.14 Solubilidade em água, solubilidade em etanol, umidade e ângulo de contato de filmes à base de WPI preparados com diferentes formulações.

Filme	Solubilidade em água (%)	Solubilidade em etanol (%)	Umidade (%)	Ângulo de contato (°)
I10G50	50,9 ± 5,2 ^{a,c}	5,0 ± 1,3 ^d	41,8 ± 5,1 ^{b,c}	75,5 ± 1,1 ^b
I10G50UV1	39,4 ± 6,1 ^{b,c}	5,2 ± 0,5 ^d	32,0 ± 4,1 ^b	91,1 ± 3,1 ^a
I10G50UV10	33,0 ± 0,7 ^b	5,6 ± 0,3 ^d	34,9 ± 1,0 ^{b,c}	78,5 ± 1,5 ^b
I10G50UV20	38,4 ± 3,2 ^b	23,9 ± 0,2 ^a	42,3 ± 4,4 ^{b,c}	70,2 ± 2,3 ^{b,c}
I10G50UV40	50,6 ± 0,8 ^{a,c}	29,5 ± 4,7 ^{a,c}	43,4 ± 1,4 ^c	70,1 ± 5,8 ^{b,c}
I10G70	53,4 ± 1,0 ^a	34,5 ± 0,3 ^{b,c}	62,8 ± 5,4 ^a	37,7 ± 6,5 ^e
I10G70UV10	41,4 ± 7,7 ^{b,c}	39,5 ± 0,7 ^b	38,2 ± 9,4 ^{b,c}	69,4 ± 4,4 ^{b,c}
I10G70UV20	59,4 ± 0,4 ^a	40,4 ± 0,2 ^b	43,8 ± 0,4 ^c	55,9 ± 2,1 ^d
I10G70UV40	57,3 ± 4,0 ^a	31,2 ± 0,2 ^{a,c}	41,9 ± 2,2 ^{b,c}	61,8 ± 3,1 ^{c,d}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Pela análise do ângulo de contato dos filmes à base de WPI (Tabela 4.14), verifica-se que houve aumento do valor com a incorporação de OSU nas concentrações de 1 %, para a formulação contendo 50 % de glicerol, e de 10 %, para a formulação contendo 70 % de glicerol. Apesar desse aumento, os filmes ainda mantiveram um caráter hidrofílico e começaram a inchar imediatamente após a deposição da gota de água, não sendo possível a determinação do ângulo de contato com o decorrer do tempo. O inchamento local ocorreu provavelmente em função da presença do glicerol, em decorrência de sua higroscopicidade (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). Bahram et al. (2014), durante a investigação da incorporação de óleo de cinamomo em filmes à base de WPI, verificaram que concentrações de 0,8 % e 1,5 % de óleo acarretaram um aumento no ângulo de contato (ângulos de 30° a 57°). Galus & Kadzińska (2016b) também encontraram valores superiores de ângulo de contato com a incorporação de óleos de amêndoa e noz, nas concentrações de 0,5 % e 1 %, em filmes à base de WPI; para ambas as concentrações, os filmes apresentaram caráter hidrofílico (ângulos de 36° a 61°).

Na Figura 4.4 estão apresentadas as imagens das medidas de ângulo de contato para os filmes à base de soro do leite e gelatina, com a adição de quitosana ou de nano-quitosana. O ângulo de contato indica a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade da superfície da película. Isto é geralmente utilizado para estimar a afinidade do filme com a água (PHAN et al., 2005). A resistência à água de filmes comestíveis/biodegradáveis desempenha um papel importante na proteção dos alimentos quando estão em contato com a água durante o armazenamento de produtos revestidos (BOURTOOM; CHINNAN, 2008). Quando o ângulo de contato é maior do que 90°, o filme é considerado de natureza hidrofóbica e quando o ângulo é inferior a 90°, o

material apresenta propriedades hidrofílicas. Vale ressaltar que proteínas e carboidratos têm tendências hidrofílicas.

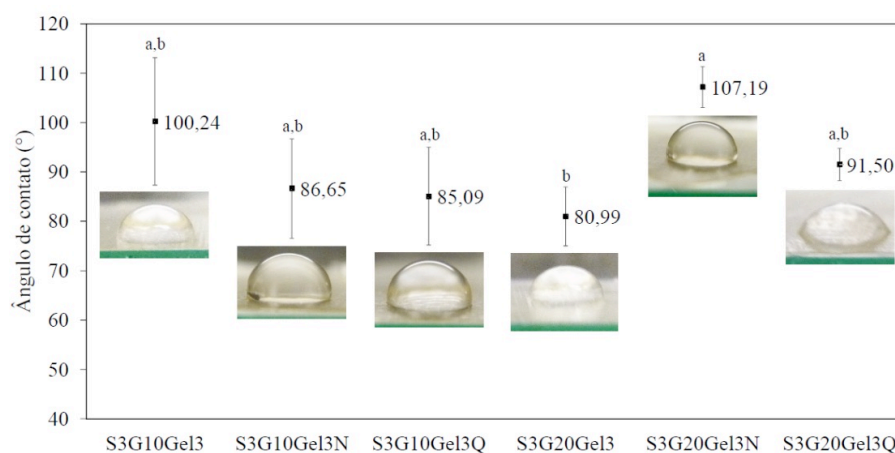


Figura 4.4 Fotografias das medidas de ângulo de contato para os diferentes filmes à base de soro de leite e gelatina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os ângulos de contato obtidos foram superiores aos encontrados na literatura para filmes à base de proteína isolada e concentrada do soro de leite ($37-92,4^\circ$) (BAHRAM et al., 2014; JAFARI et al., 2015; KADAM et al., 2013; KOKOSZKA et al., 2010b; RAMOS et al., 2013), porém próximos aos valores obtidos para filmes à base de gelatina ($85-105^\circ$) (FLAKER et al., 2014; WANG et al., 2016). O contato com a água líquida pode acarretar uma mudança drástica no estado físico da superfície do filme e afetar a medição do ângulo de contato em função do tempo (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). Todas as amostras de filmes começaram a inchar imediatamente após a deposição da gota de água, não sendo possível a determinação do ângulo de contato com o decorrer do tempo.

4.3.1.3 Propriedades morfológicas

Através da análise das fotomicrografias da seção transversal dos filmes à base de soro de leite e gelatina sem e com a adição de quitosana ou de nano-quitosana, foi possível verificar que todas as formulações mostraram estruturas semelhantes.

Na Figura 4.5 estão apresentadas as fotomicrografias da seção transversal de uma formulação sem adição de quitosana e outra com adição de quitosana. As demais fotomicrografias de seção transversal estão contidas no Apêndice B (Figura B.1).

Os filmes apresentaram estrutura uniforme e densa, com aparência homogênea, independente da composição. Além disso, a estrutura lisa e compacta indica uma boa compatibilidade entre os componentes, sugerindo que a quitosana e a nano-quitosana, quando adicionadas, estão uniformemente dispersas na matriz dos biopolímeros. Pequenas

descontinuidades através dos filmes são atribuídas ao glicerol e algumas impurezas, originalmente presentes no material ou incompleta solubilidade de alguns grãos (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). As imagens de MEV não mostraram diferenças microestruturais significativas entre as amostras analisadas.

As micrografias de superfície obtidas por MEV revelaram uma matriz lisa e com boa integridade para os filmes à base de soro do leite e gelatina.

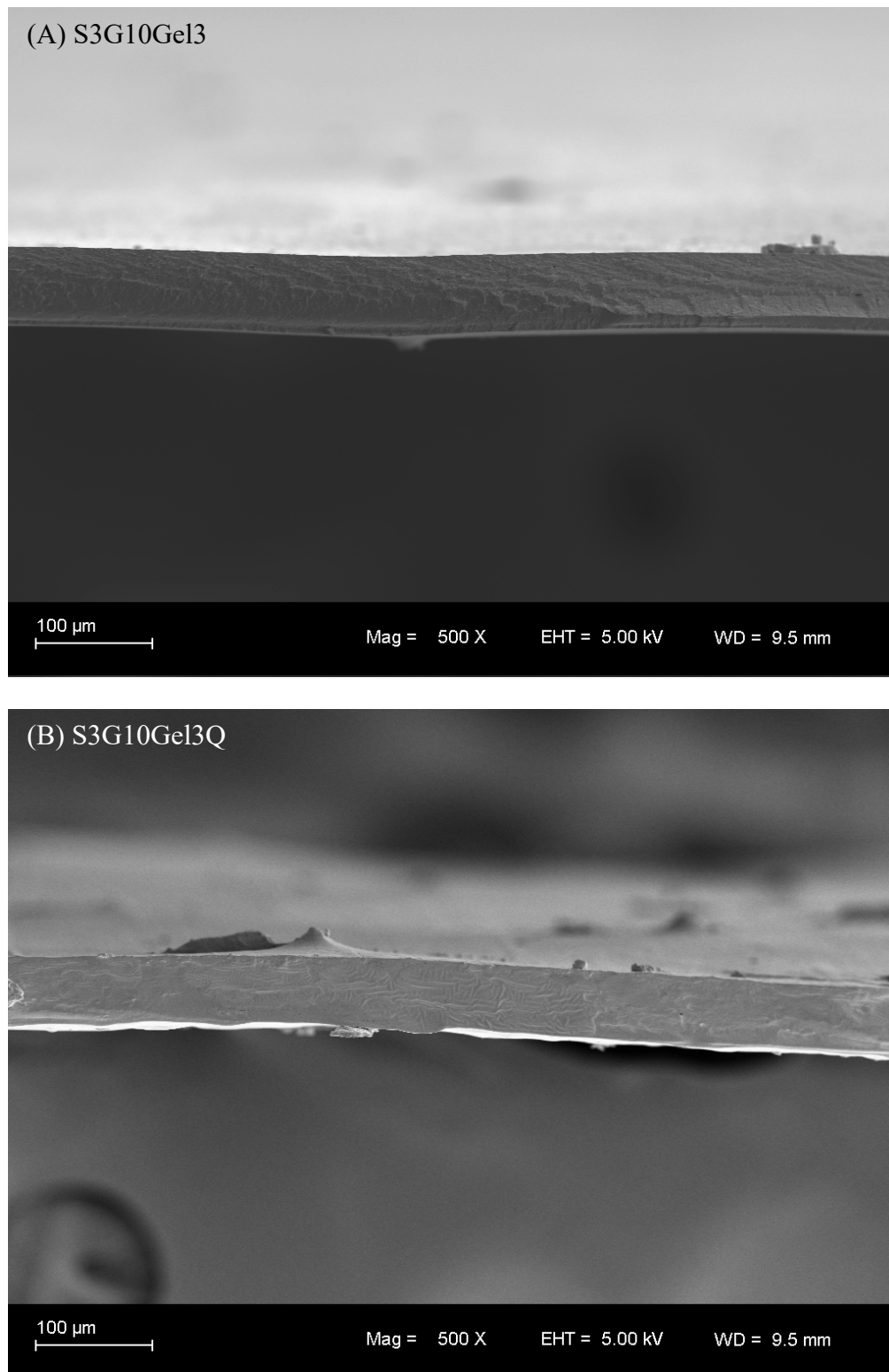


Figura 4.5 Fotomicrografias de filmes à base de soro de leite e gelatina sem e com adição de quitosana, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) S3G10Gel3 e (B) S3G10Gel3Q.

Através da análise das fotomicrografias da seção transversal dos filmes à base de WPI foi possível verificar que todas as formulações sem a presença de OSU mostraram estruturas semelhantes, assim como os filmes contendo OSU apresentaram estrutura equivalente. Na

Figura 4.6 estão as fotomicrografias da seção transversal de uma formulação sem adição de OSU e outra com adição de OSU. As demais fotomicrografias de seção transversal estão contidas no Apêndice B (Figura B.2).

Durante a etapa de preparação dos filmes à base de WPI, foi observada uma diferença de aparência entre os lados: a superfície superior oleosa (em contato com o ar) e a inferior seca e brilhante (em contato com a placa). Observações semelhantes são relatadas na literatura (GALUS; KADZIŃSKA, 2016a; SHAW et al., 2002; YANG; PAULSON, 2000).

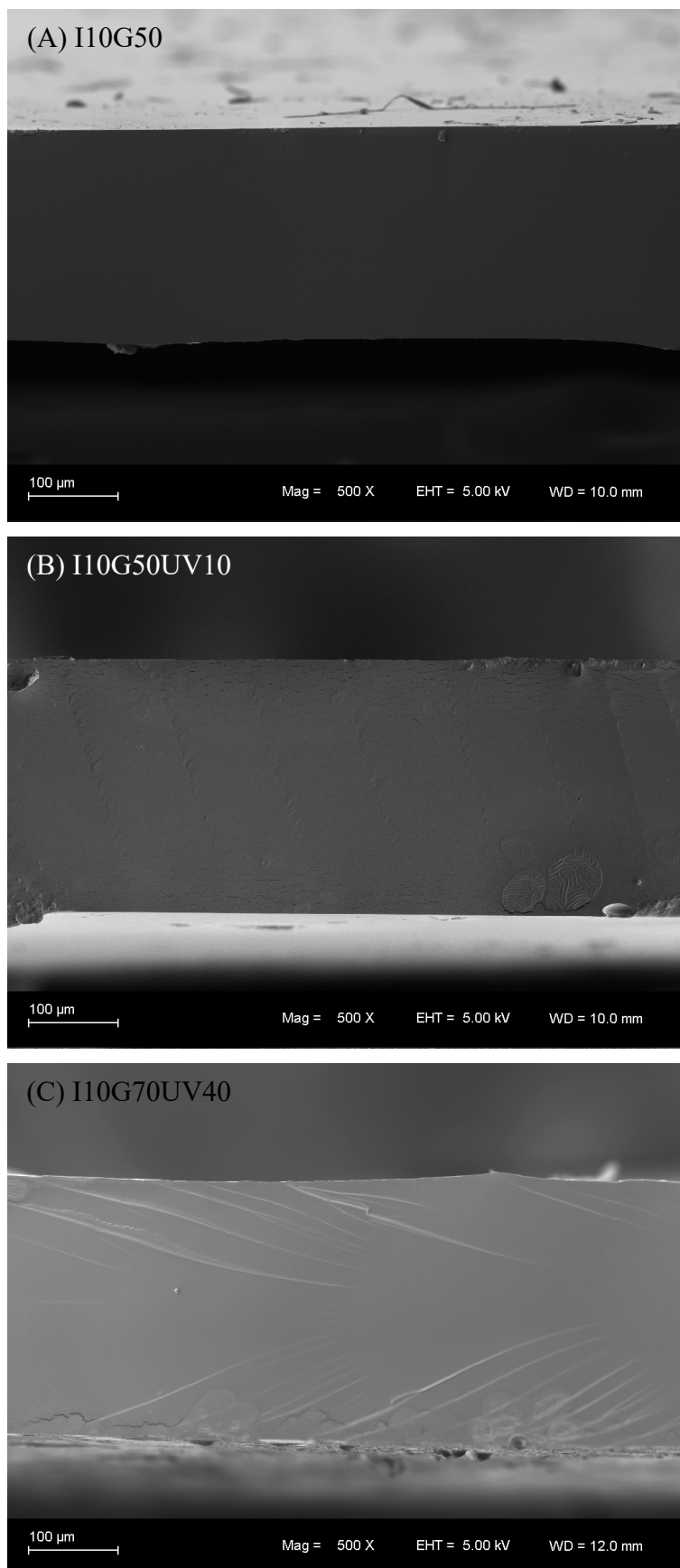


Figura 4.6 Fotomicrografias da seção transversal de filmes à base de WPI sem e com adição de OSU, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) I10G50, (B) I10G50UV10 e (C) I10G70UV40.

Filmes à base de WPI sem adição de OSU exibiram uma estrutura homogênea e lisa, justificando uma boa compatibilidade entre os componentes e uma baixa tendência hidrofílica do filme (Figura 4.6 A). Por outro lado, os filmes contendo OSU apresentaram algumas irregularidades nas suas estruturas (Figura 4.6 B e C), devido à falta de miscibilidade entre os componentes. Pode ser concluído que durante a etapa de secagem, o OSU migrou em direção à superfície do filme, o que deveria levar a uma diminuição da hidrofilicidade. Porém, esse aumento não é observado para os filmes contendo maiores concentrações de OSU (20 % e 40 %), uma vez que esses apresentaram grandes descontinuidades estruturais (Figura 4.6 C), o que pode estar diretamente relacionado às propriedades mecânicas inferiores às demais formulações, maior solubilidade em água e maior hidrofilicidade (menor ângulo de contato). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura (FABRA; TALENS; CHIRALT, 2009; JAFARI et al., 2015; MA et al., 2012; PHAN THE et al., 2009; ZÚÑIGA et al., 2012).

Desta forma, é possível concluir que a estrutura da película depende do teor de lipídeos. Uma crescente concentração de óleo resultou em uma camada lipídica maior na superfície superior, aumentando assim a irregularidade da estrutura da película. Essa diferença pode afetar algumas propriedades relacionadas com a superfície do filme, como a adsorção de água ou parâmetros óticos (GALUS; KADZIŃSKA, 2016a).

4.3.1.4 Estrutura química

Os espectros de FTIR obtidos para os filmes à base de soro de leite apresentaram comportamento semelhante. Na Figura 4.7 está apresentado o espectro da formulação S3G10Gel3, as demais estão contidas no Apêndice B (Figura B.3). As bandas localizadas em $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ correspondem aos grupos -OH e -NH livres e ligados, que podem formar uma ligação H- com a ligação peptídica da proteína através do grupo carbonila (GUERRERO et al., 2011). As bandas de intensidade mais alta foram observadas para o soro de leite a 3305 cm^{-1} e para a gelatina a 3350 cm^{-1} , relacionadas ao alongamento e vibração -OH e -NH. Para filmes à base de soro e gelatina, essa banda é deslocada, diminuindo sua intensidade. Essa mudança sugere que as ligações de hidrogênio ocorrem entre o grupo amino e -OH das moléculas de proteína. Também indica que a hidrofilicidade foi reduzida, uma vez que os grupos OH livres de gelatina estão mais envolvidos na associação de ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, menos suscetíveis à hidratação (LE TIEN et al., 2000). Todas as amostras apresentaram bandas características em regiões próximas a 1630 , 1550 e 1230 cm^{-1} , correspondentes aos grupos funcionais de amida I, amida II e amida III, respectivamente (PEREDA et al., 2011). A absorvância da região da banda ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) na amida I, que é predominantemente

governada pelo alongamento da vibração da ligação do peptídeo carbonil, que é altamente influenciado pela ligação do hidrogênio e, portanto, à estrutura secundária da proteína (GILBERT et al., 2005). A banda associada à amida I para as amostras foi centralizado em 1620 cm^{-1} , sendo essa característica das estruturas folhas- β das proteínas (FARRELL et al., 2002). A banda localizada em 1530 cm^{-1} corresponde à amida II (combinação $\delta(\text{N} - \text{H})$ e $\nu(\text{C} - \text{N})$), contribuindo para as vibrações do grupo de ligações peptídicas das proteínas (PEREDA et al., 2011). As bandas de 1400 a 1200 cm^{-1} foram relacionadas à região amida III e vibração de alongamento C-N (HOQUE et al., 2011). A banda centralizada em 1393 cm^{-1} pode estar relacionada ao alongamento de C = O nas cadeias laterais de ácido carboxílico dos aminoácidos presentes na proteína de soro de leite. Essa banda foi associada à vibração de estiramento de carbonila, provavelmente causada por estruturas de carbonila, como aldeídos ou ésteres (FARRELL et al., 2002). A banda próxima a 1230 cm^{-1} corresponde à flexão de deformação do CH nos grupos CH_2 (HOQUE et al., 2011). A banda a 1023 cm^{-1} é decorrente das interações entre o plastificante (grupo OH do glicerol) e a estrutura do filme (DE OLIVEIRA et al., 2019), mostrando que houve interações químicas entre as proteínas e o plastificante. A banda na região espectral de 800 a 1150 cm^{-1} pode ser atribuída às bandas de glicerol correspondentes às vibrações das ligações C-C e C-O (DE OLIVEIRA et al., 2019; RAMOS et al., 2013).

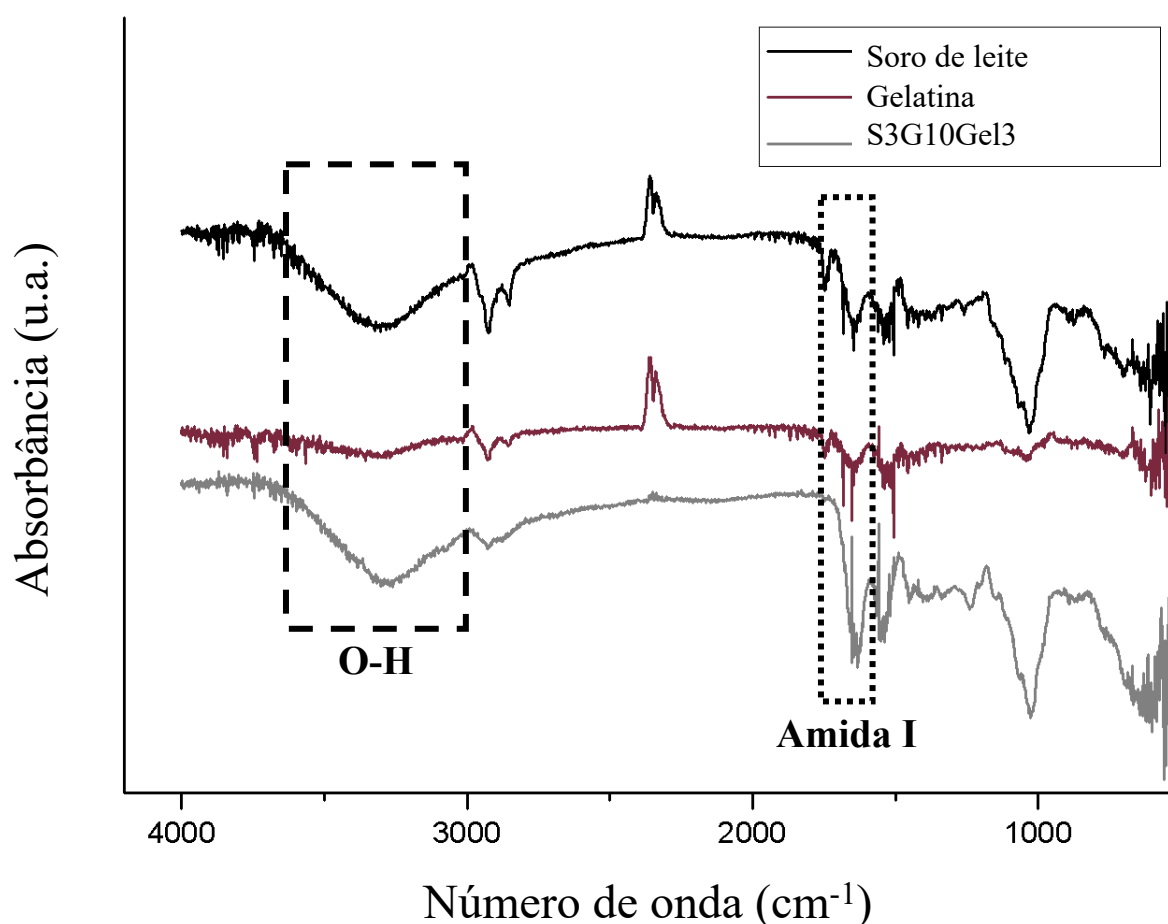


Figura 4.7 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do filme à base de soro de leite e gelatina de formulação S3G10Gel3.

Em geral, a adição de quitosana e de nano-quitosana mostrou apenas um efeito aditivo nas bandas características, sem a presença de novas interações visíveis. Esses resultados indicam que a quitosana e a nano-quitosana parecem estar simplesmente dispersas na película de soro de leite e gelatina.

Os espectros de FTIR obtidos para os filmes à base de WPI também apresentaram comportamento semelhante. Na Figura 4.8 está apresentado o espectro da formulação I10G50, as demais estão apresentadas no Apêndice B (Figura B.4). Todas as amostras de filmes apresentaram bandas características em regiões próximas a 1638, 1534 e 1230 cm^{-1} , correspondendo aos grupos amida I, amida II e amida III, respectivamente (PEREDA et al., 2011). A amida I, banda intensa próxima a 1638 cm^{-1} , é sensível à estrutura secundária da proteína e representa principalmente a vibração de estiramento C=O do grupo amida (GILBERT et al., 2005). A banda próxima a 1534 cm^{-1} é devido à vibração de flexão do grupo N-H. As bandas próximas a 1450 a 1230 cm^{-1} indicam vibrações de alongamento C-N e N-H (PEREDA et al., 2011). A banda situada no comprimento de onda de 1037 cm^{-1} é devido às

interações entre o plastificante (grupo OH do glicerol) e à estrutura do filme (HOQUE et al., 2011), indicando que houve interação entre o glicerol e as proteínas. A região espectral de 800 a 1150 cm^{-1} pode ser atribuída às bandas de absorção do glicerol correspondentes às vibrações das ligações C-C e C-O (RAMOS et al., 2013).

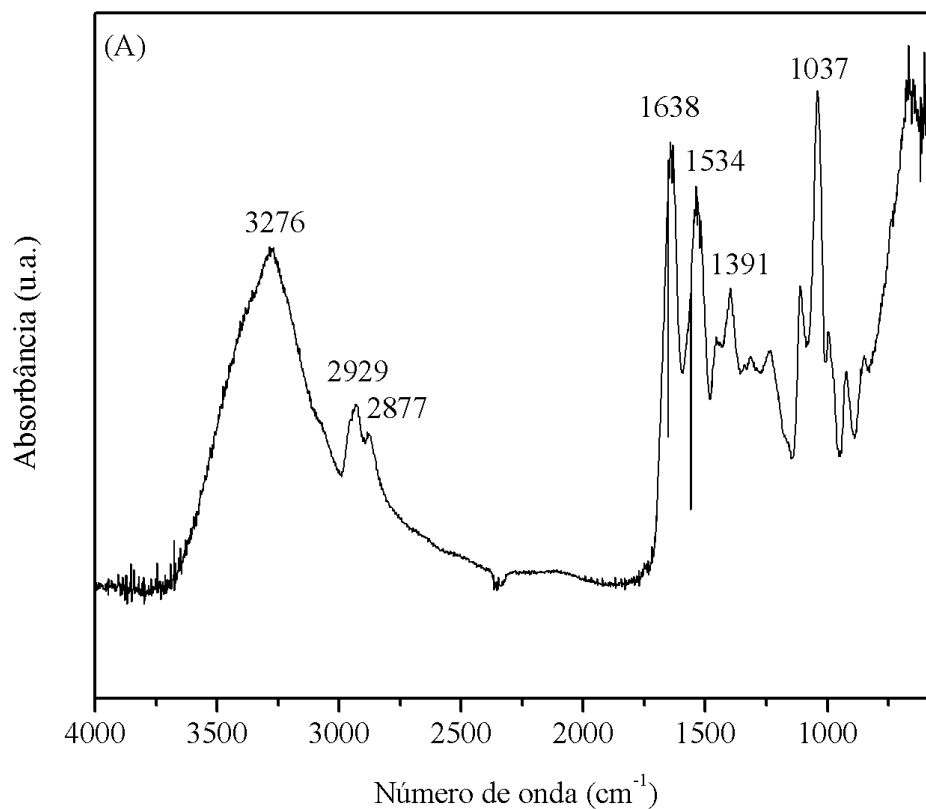


Figura 4.8 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do filme à base de WPI de formulação I10G50.

4.3.1.5 Propriedades de barreira

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos diferentes filmes à base de soro de leite e gelatina são mostrados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 Permeabilidade ao vapor de água de filmes à base de soro do leite e gelatina preparados com diferentes formulações.

Amostra	Permeabilidade ao vapor de água (g mm/m ² h kPa)
S3G10Gel3	0,546 ± 0,079 ^c
S3G10Gel3N	0,555 ± 0,028 ^c
S3G10Gel3Q	0,564 ± 0,053 ^{b,c}
S3G20Gel3	0,708 ± 0,021 ^{a,b}
S3G20Gel3N	0,796 ± 0,044 ^a
S3G20Gel3Q	0,795 ± 0,085 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em decorrência da influência direta sobre as reações de deterioração em produtos alimentares embalados, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) é a propriedade mais importante de filmes à base de biopolímeros. A alta PVA torna inadequado seu uso para diversas aplicações. Ao contrário de materiais poliméricos sintéticos hidrofóbicos, o efeito da espessura na PVA dos filmes preparados com biopolímeros é muito mais significativo devido à elevada afinidade pela água. O efeito da espessura pode ser explicado pela natureza hidrofílica da maioria dos biopolímeros, uma vez que a difusividade do vapor de água destes materiais é dependente da umidade (ABUGOCH et al., 2011; MCHUGH; AVENABUSTILLOS; KROCHTA, 1993; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2009).

O aumento da concentração do glicerol acarreta um aumento da PVA, podendo estar relacionado com a hidrofiliidade do plastificante e ao aumento do espaçamento intermolecular decorrente da redução das ligações de hidrogênio interna das moléculas de proteína causada pela adição do glicerol (CUQ et al., 1997; JAVANMARD; GOLESTAN, 2008; MCHUGH; AUJARD; KROCHTA, 1994). Os valores encontrados são inferiores aos relatados na literatura para filmes à base de proteínas do soro de leite (2-10,14 g mm/m² h kPa) (BANERJEE; CHEN, 1995; JAVANMARD; GOLESTAN, 2008; SOAZO; RUBIOLO; VERDINI, 2011; WANG; AUTY; KERRY, 2010).

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) das diferentes formulações à base de WPI e OSU são mostrados na Tabela 4.16. Para as formulações contendo 50 % de glicerol, a incorporação das menores concentrações de OSU (1 % e 10 %) reduziu a PVA, porém com adição de 40 % houve aumento da PVA. Para as formulações contendo 70 % de glicerol, a incorporação de 20 % e 40 % de OSU acarretou um aumento da PVA. Isto pode ser ter ocorrido em função da migração do óleo para a superfície da película, conforme explicado anteriormente. Além disso, os filmes com maior concentração de OSU apresentaram grandes descontinuidades estruturais, o que pode ter ocasionado um aumento na PVA. O mesmo comportamento foi

encontrado por Ma et al. (2012), ao incorporarem óleo de oliva em filmes à base de gelatina. A incorporação de azeite na matriz de gelatina melhorou a capacidade de barreira à água dos filmes em qualquer razão óleo/proteína. A PVA dos filmes mostrou uma tendência aumentada quando a quantidade de óleo aumentou de 1 % para 10 % ou 20 % e depois diminuiu com o aumento da fase oleosa. A microestrutura dos filmes, por exemplo, tamanho das gotículas lipídicas ou distribuição na matriz dos filmes, contribuem diretamente na eficiência da barreira à água dos filmes com lipídeos.

Tabela 4.16 Permeabilidade ao vapor de água de filmes à base de WPI preparados a partir de diferentes formulações.

Filme	Permeabilidade ao vapor de água (g mm/m ² h kPa)
I10G50	10,98 ± 0,77 ^b
I10G50UV1	6,34 ± 0,97 ^d
I10G50UV10	9,26 ± 0,05 ^c
I10G50UV20	9,06 ± 1,28 ^{b,c}
I10G50UV40	13,73 ± 0,53 ^a
I10G70	9,43 ± 0,46 ^{c,d}
I10G70UV10	8,04 ± 0,32 ^{b,c}
I10G70UV20	10,33 ± 0,90 ^b
I10G70UV40	11,20 ± 0,76 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Na literatura são encontrados diferentes valores de PVA, uma vez que a PVA depende das condições estabelecidas para a análise bem como da formulação do filme. Javanmard & Golestan (2008) avaliaram a PVA de filmes à base de WPC (10 %) e glicerol (razão glicerol:proteína de 0,6) incorporados com óleo de oliva; para os filmes sem óleo, encontraram uma PVA de $10,4 \pm 8,7$ g mm/m² h kPa, com a incorporação de óleo de oliva na razão de 0,2 (óleo:proteína) a PVA foi de $10,14 \pm 8,2$ g mm/m² h kPa e para 0,4 (óleo:proteína) a PVA foi de $8,09 \pm 5,8$ g mm/m² h kPa, não havendo alteração significativa da PVA com a incorporação do óleo, uma vez que filmes altamente plastificados têm propriedades de barreira à umidade tão pobres que pequenas diminuições na PVA do filme são obscurecidas. Em contrapartida, Bahram et al. (2014) obtiveram uma PVA de $0,93 \pm 0,09$ g mm/m² h kPa para películas à base de WPC (8 % m/v) e glicerol (8 % m/v), com a incorporação de 0,8 % de óleo essencial de cinamomo a PVA foi de $0,79 \pm 0,09$ g mm/m² h kPa e com a incorporação de 1,5 % foi de $0,73 \pm 0,04$ g mm/m² h kPa, relatando que a incorporação de óleos essenciais em uma matriz polimérica pode melhorar a PVA dos filmes, através do aumento da parcela hidrofóbica do filme. Em outras palavras, a transferência de vapor de água pode ocorrer através da porção

hidrofílica do filme e depende da razão hidrofílica-hidrofóbica dos componentes do filme, sendo assim, a natureza hidrofóbica do óleo essencial potencialmente poderia aumentar a hidrofobicidade dos filmes de proteína de soro de leite. Xiao et al. (2016) obtiveram o mesmo comportamento ao incorporar óleo de palma em filmes à base de gelatina e glicerol, conseguindo reduzir a PVA de 0,08 g mm/m² h kPa para 0,06 g mm/m² h kPa.

4.3.1.6 Análises térmicas

As curvas de DSC das amostras de filmes mostraram compatibilidade do glicerol com o soro do leite e a gelatina, e a eficácia do processo de plastificação. Na Tabela 4.17 são apresentadas as temperaturas de transição vítrea (T_g), inicial de decomposição (T_d), máxima de degradação (T_{max}), a perda de massa e o resíduo para as diferentes formulações de filmes à base de soro do leite e gelatina. Em todas as amostras houve a ocorrência de apenas uma T_g , não sendo detectados eventos térmicos relacionados à fusão ou à cristalização na faixa de temperaturas avaliada (25 °C a 110 °C), isto sugere que as amostras se encontram no estado amorfo nessa faixa ou que degradaram antes de fundir. As curvas também indicam que o plastificante, o soro de leite e a gelatina permaneceram um material homogêneo em todo o ciclo de arrefecimento e aquecimento, uma vez que não foi observada separação de fases (T_g separadas ou picos de fusão e de cristalização na faixa de temperatura testada). Se polímeros e plastificantes ou a mistura de dois polímeros são imiscíveis, a mistura irá apresentar dois valores de T_g correspondente às duas fases puras (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2009). Também se observa uma pequena redução da T_g com o aumento da concentração de glicerol. Essa diminuição na estabilidade térmica pode ser decorrente da redução da interação entre as proteínas ocasionada pela adição de glicerol, que provavelmente estabiliza a estrutura de rede (BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003). Ramos et al. (2013) verificaram que o aumento do teor de glicerol diminuiu os valores de T_g . Para filmes à base de proteína isolada do soro de leite (10% m/m) em diferentes concentrações de glicerol (40, 50 e 60% m/m) foram encontrados valores de T_g de $50,2 \pm 0,7$ °C, $46,9 \pm 0,5$ °C e $42,9 \pm 0,4$ °C, respectivamente. A T_g é geralmente associada ao movimento segmentar molecular da estrutura desordenada (amorfo). Além disso, as análises térmicas de películas à base de proteínas variam de acordo com as fontes das proteínas, bem como sobre a integridade, a massa molar e a estrutura de rede das proteínas.

Tabela 4.17 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) para filmes à base de soro do leite e gelatina preparados a partir de diferentes formulações.

Amostra	T_g (°C)	T_d (°C)	T_{max} (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%) _{800°C}
S3G10Gel3	33,5	180,8	308,8	50,9	25,6
S3G10Gel3N	33,8	184,2	322,7	45,3	24,1
S3G10Gel3Q	31,8	182,1	315,3	54,1	26,3
S3G20Gel3	30,9	215,1	311,8	55,6	25,7
S3G20Gel3N	33,5	187,4	311,9	54,2	24,0
S3G20Gel3Q	30,7	170,0	314,8	44,2	24,6

As curvas de TGA e de DTG dos filmes à base de soro de leite e gelatina apresentaram comportamento semelhante. Na Figura 4.9 é apresentado a curva de uma formulação (S3G10Gel3), as demais estão contidas no Apêndice B (Figura B.5).

Todos os filmes analisados apresentaram três etapas de decomposição térmica. Na primeira etapa, uma perda de massa inicial de aproximadamente 14 % (m/m) foi observada na faixa de 150 a 170 °C. Esta perda inicial pode estar relacionada com a perda de água livre presente e adsorvida pelos filmes (NUTHONG; BENJAKUL; PRODPRAN, 2009; RHIM; PARK; HA, 2013; RHIM; WANG; HONG, 2013; SU et al., 2010). Na segunda etapa, os filmes iniciaram a decomposição entre 180 e 215 °C, que pode ser atribuída à decomposição do glicerol incorporado à matriz do filme (SHANKAR et al., 2015), estando de acordo com a T_d do glicerol. Na terceira etapa os filmes apresentaram uma perda acentuada de massa entre 250 e 800 °C, que está principalmente associada com a degradação do soro do leite e da gelatina, estando de acordo com a T_d desses componentes. Essa etapa também está associada com a degradação oxidativa dos resíduos de carbono formados durante a degradação do soro do leite e da gelatina.

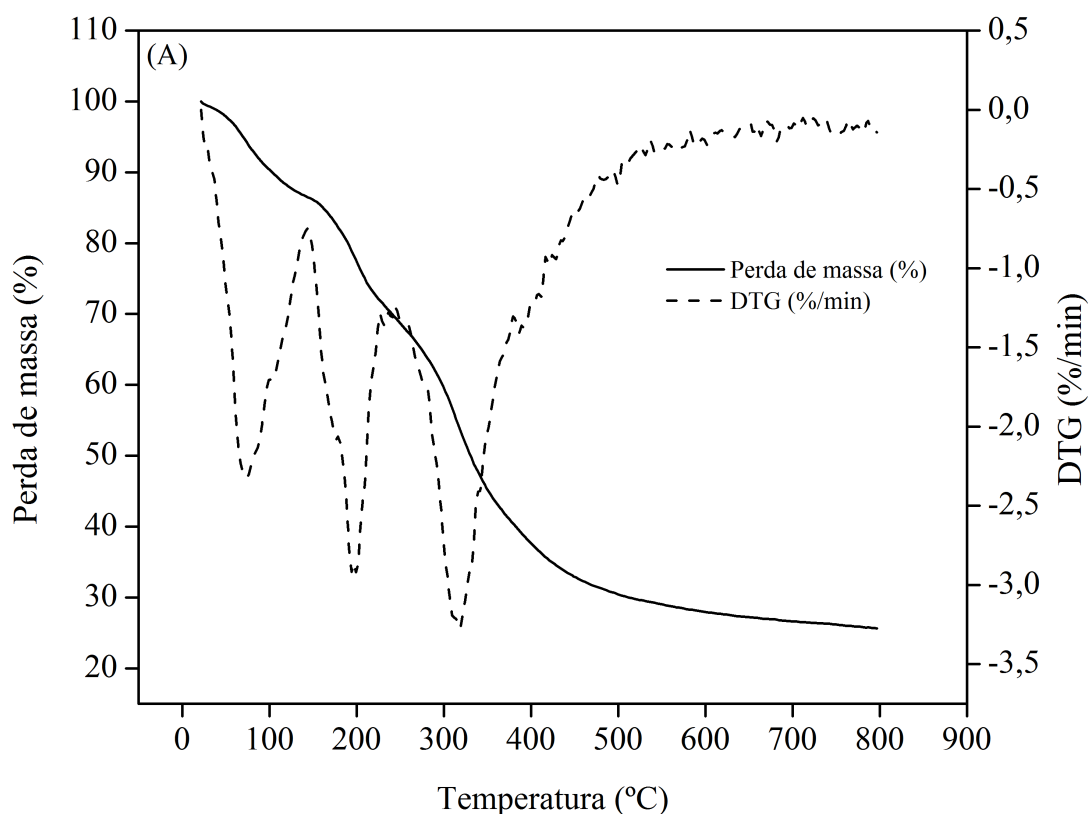


Figura 4.9 Termograma TGA e DTG do filme S3G10Gel3 à base de soro de leite e gelatina.

Escrevendo as formulações em ordem crescente de estabilidade térmica tem-se a seguinte relação: S3G10Gel3N < S3G10Gel3Q < S3G10Gel3 < S3G20Gel3Q < S3G20Gel3 < S3G20Gel3N. Após a decomposição térmica, o percentual de resíduo dos filmes foi de aproximadamente 25 %. Os termogramas obtidos mostraram que todos os filmes exibem uma única T_d , o que é uma indicação de boa compatibilidade entre o soro do leite, a gelatina e o glicerol (RAMOS et al., 2013). Comportamento semelhante é encontrado na literatura (AZEVEDO et al., 2015; BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003; RAMOS et al., 2013; SHANKAR et al., 2015), onde as curvas de TGA obtidas para diferentes filmes à base de soro de leite e/ou gelatina apresentaram três etapas de decomposição térmica e uma única T_d .

Em todas as curvas de DSC das amostras dos filmes à base de WPI houve a ocorrência de apenas uma T_g (Tabela 4.18), não sendo detectados picos relacionados com a fusão ou a cristalização na faixa de temperatura avaliada (25 °C a 110 °C), o que sugere que as amostras se encontram no estado amorfo. Os termogramas também indicam que o plastificante, o WPI e o OSU resultaram em um material homogêneo em todo o ciclo de arrefecimento e aquecimento, uma vez que não foi observada separação de fases (T_g separadas ou picos de fusão e de cristalização). Esses resultados sugerem que houve compatibilidade do glicerol com o WPI e o OSU e o processo de plastificação foi eficaz. Os valores de T_g dos filmes sem e com OSU

ficaram próximos de 34 °C e foram inferiores aos informados por Ramos et al. (2013), de $43,6 \pm 0,6$ °C para filmes à base de WPC (10 % m/m) e glicerol (40 % m/m de proteína seca). Porém, de acordo com Osés, Fernández-Pan, Mendoza, & Maté (2009), a T_g de filmes à base de WPI deve se situar entre 20 °C e 50 °C, diminuindo com o aumento do teor de glicerol.

Tabela 4.18 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) de filmes à base de WPI preparados a partir de diferentes formulações.

Filme	T_g (°C)	T_d (°C)	T_{max} (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%) _{800°C}
WPI	33,3	302,6	347,9	37,0	21,5
Glicerol	33,5	260,7	272,6	86,3	0,1
OSU	34,1	378,1	412,6	90,6	8,7
I10G50	34,2	201,2	281,1	58,8	16,8
I10G50UV1	34,3	209,8	308,3	51,6	16,0
I10G50UV10	34,0	207,2	303,1	58,4	19,2
I10G50UV20	34,0	183,5	279,7	67,3	14,6
I10G50UV40	33,9	212,9	305,1	54,2	16,0
I10G70	34,1	201,7	253,4	66,4	19,3
I10G70UV10	34,4	213,7	303,1	54,2	14,6
I10G70UV20	34,2	198,3	257,9	70,0	13,8
I10G70UV40	34,1	211,6	285,6	59,3	14,4

As curvas de TGA e de DTG dos filmes à base de WPI apresentaram comportamento semelhante. Na Figura 4.10 é apresentado o espectro da formulação I10G50, as demais estão apresentadas no Apêndice B (Figura B.6). Todos os filmes à base de WPI sem e com a incorporação de OSU apresentaram três etapas de decomposição térmica (Figura 4.10). Na primeira etapa uma perda de massa inicial de 10 % a 15 % (m/m) foi observada na faixa de 25 °C a 150 °C. Esta perda inicial pode estar relacionada com a perda de água livre adsorvida sobre as películas (NUTHONG, BENJAKUL, & PRODPRAN, 2009; RHIM, WANG, & HONG, 2013; RHIM, PARK, & HA, 2013; SU, HUANG, YUAN, WANG, & LI, 2010). Na segunda etapa os filmes iniciaram a decomposição entre 180 °C e 215 °C (Tabela 4.18) e apresentaram uma perda acentuada de massa entre 150 °C e 290 °C, que está associada à decomposição do glicerol incorporado à matriz do filme (SHANKAR et al., 2015), estando de acordo com a T_d do glicerol (260,7 °C), e também associada com a degradação do WPI. Uma terceira etapa de degradação é observada entre 290 °C e 800 °C, que pode estar relacionada com a degradação do OSU ($T_d = 378,1$ °C) e residual do WPI. Esta etapa também pode estar associada com a degradação oxidativa dos resíduos de carbono formados durante a degradação

do WPI. Comportamento semelhante é relatado na literatura por diversos autores (AZEVEDO et al., 2015; BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003; KADAM et al., 2013; RAMOS et al., 2013; SHANKAR et al., 2015), onde as curvas de TGA obtidas para diferentes filmes à base de soro de leite apresentaram três etapas de decomposição térmica e uma única T_d .

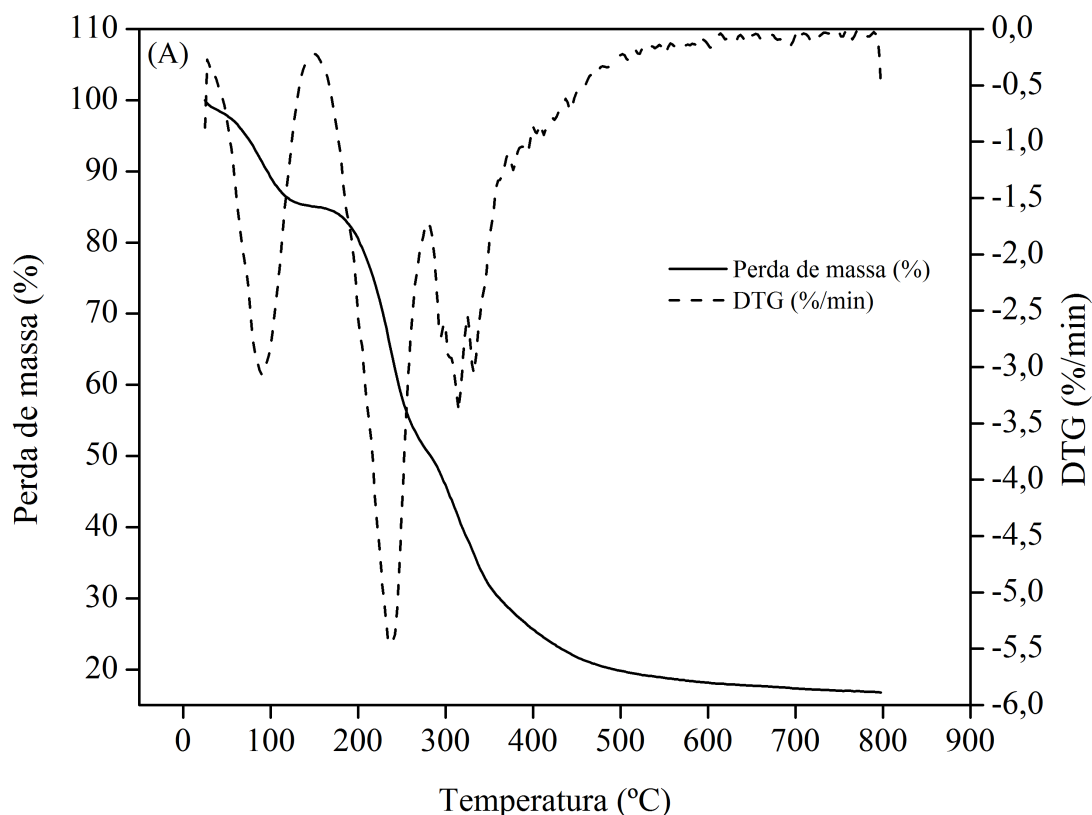


Figura 4.10 Termograma TGA e DTG do filme I10G50.

Após a decomposição térmica, o percentual de resíduo dos filmes foi de aproximadamente 15 % (Tabela 4.18). Os termogramas mostraram que todos os filmes exibem uma única T_d , o que indica uma boa compatibilidade entre os componentes (RAMOS et al., 2013).

4.3.1.7 Seleção da melhor formulação

Com base em todas as caracterizações apresentadas anteriormente, foi selecionada a formulação S3G20Gel3Q como sendo a formulação de filme à base de soro do leite e gelatina com as melhores propriedades para aplicação como embalagem de alimentos. Essa formulação apresentou propriedades mecânicas intermediária às demais formulações, essa formulação apresentou uma menor espessura, maior transparência, menor solubilidade em água, com valores de solubilidade em etanol, umidade e permeabilidade ao vapor de água muito próximos às demais formulações, exibindo uma boa estabilidade térmica. Além disso, através de testes

preliminares, foi observado que as formulações com adição de quitosana apresentaram um retardamento no crescimento microbiano.

Com relação às embalagens preparadas à base de WPI foram selecionadas duas formulações, I10G50 e I10G50UV10 que apresentaram as melhores propriedades para aplicação como embalagem de alimentos de filmes. Uma vez que a proteína isolada do soro de leite é a mais utilizada para a fabricação de filmes e considerando que não há dados na literatura em relação à incorporação de óleo de semente de uva, optou-se por uma formulação sem e outra com o aditivo, para fins de comparação.

4.4 Comparação entre os filmes

Os filmes selecionados como melhores foram comparados entre si de acordo com sua fonte de proteína: soro de leite e gelatina (S3G20Gel3) e proteína isolada (I10G50 e I10G50UV10), em relação as suas propriedades mecânicas, físicas, de barreira e térmicas.

Em relação às propriedades mecânicas (Tabela 4.19), é possível verificar que o filme I10G50 apresenta o maior ε_b , porém o menor E e menor σ_b . Apesar da incorporação de óleo de semente de uva diminuir o alongamento, os demais parâmetros aumentam. Em contrapartida, o filme S3G10Gel3Q apresenta o maior E e o maior σ_b . Desta forma, constata-se que o filme à base de soro de leite apresenta as melhores propriedades mecânicas, visando a sua aplicação como embalagem de produtos lácteos.

Tabela 4.19 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ε_b) e tensão de ruptura (σ_b) dos melhores filmes selecionados.

Filme	Módulo de Young (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Tensão (MPa) na ruptura
S3G20Gel3Q	$7,53 \pm 3,05^a$	$6,62 \pm 1,18^c$	$5,89 \pm 0,87^a$
I10G50	$0,22 \pm 0,01^c$	$46,27 \pm 13,54^a$	$0,49 \pm 0,19^c$
I10G50UV10	$1,66 \pm 0,65^b$	$13,57 \pm 1,27^b$	$0,86 \pm 0,05^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para as propriedades físicas (Tabela 4.20), o filme à base de soro de leite apresentou menor espessura e menor gramatura, porém maior opacidade em comparação aos filmes à base de proteína isolada do soro de leite. Dependendo da aplicação da embalagem, uma menor espessura e maior opacidade podem ser vantajosos, como por exemplo, revestimento de alimentos lácteos para prolongamento de vida de prateleira.

Tabela 4.20 Espessura, gramatura e transparência dos melhores filmes selecionados.

Filme	Espessura (μm)	Gramatura (g/cm^2)	Opacidade
S3G20Gel3Q	$62,8 \pm 8,0^b$	$8,4 \pm 1,2^b$	$0,94 \pm 0,02^a$
I10G50	$171,0 \pm 31,1^a$	$23,8 \pm 0,9^a$	$0,20 \pm 0,02^b$
I10G50UV10	$219,1 \pm 42,6^a$	$25,4 \pm 1,1^a$	$0,22 \pm 0,04^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Entre os filmes selecionados, o filme I10G50UV10 foi o que apresentou menor solubilidade em água e em etanol (Tabela 4.21), porém maior umidade em relação ao filme S3G20Gel3Q.

Em relação ao ângulo de contato, o filme S3G20Gel3Q apresentou um maior ângulo, o que sugere uma menor hidrofobicidade do que os filmes à base de proteína isolada selecionados.

Tabela 4.21 Solubilidade em água, solubilidade em etanol e umidade dos melhores filmes selecionados.

Filme	Solubilidade em água (%)	Solubilidade em etanol (%)	Umidade (%)	Ângulo de contato ($^\circ$)
S3G20Gel3Q	$58,5 \pm 0,2^c$	$14,8 \pm 3,0^b$	$27,2 \pm 3,0^a$	$91,5 \pm 3,3^a$
I10G50	$50,9 \pm 5,2^b$	$5,0 \pm 1,3^a$	$41,8 \pm 5,1^b$	$75,5 \pm 1,1^b$
I10G50UV10	$33,0 \pm 0,7^a$	$5,6 \pm 0,3^a$	$34,9 \pm 1,0^b$	$78,5 \pm 1,5^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Na Tabela 4.22 estão apresentados os valores de permeabilidade ao vapor de água dos melhores filmes selecionados.

Tabela 4.22 Permeabilidade ao vapor de água dos melhores filmes selecionados.

Filme	Permeabilidade ao vapor de água ($\text{g mm}/\text{m}^2 \text{ h kPa}$)
S3G20Gel3Q	$0,80 \pm 0,10^a$
I10G50	$11,0 \pm 0,8^b$
I10G50UV10	$9,3 \pm 0,1^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O filme S3G20Gel3Q apresentou um valor de permeabilidade ao vapor de água significativamente inferior aos filmes à base de proteína isolada do soro de leite. Essa é uma das propriedades mais importantes dos filmes à base de biopolímeros, em decorrência da influência direta sobre as reações de deterioração em produtos alimentares embalados. A alta PVA torna inadequado seu uso para diversas aplicações.

Visando a aplicação dos filmes em alimento lácteo e em decorrência à perecibilidade desse alimento, a influência de condições externas como oxigênio, luz, microorganismos e umidade devem ser observadas. A oxidação e o crescimento microbiano em produtos lácteos podem ser causados por alta concentração de oxigênio. A perda de nutrientes, a descoloração e

a alteração de sabor podem ser provocadas pela oxidação induzida pela luz, e a presença de umidade acelera a deterioração dos produtos lácteos. Isso exige que os materiais de embalagem dos produtos lácteos tenham baixa permeabilidade ao oxigênio, à umidade e resistência à luz.

A instabilidade causada pela natureza bioquímica e biologicamente dinâmica dos queijos torna os filmes e revestimentos comestíveis amplamente aplicados para prolongar a vida útil de diversos tipos de queijo. A seleção de materiais de embalagem adequados para o queijo é desafiadora, pois existem inúmeros processos bioquímicos e microbianos envolvidos na produção do queijo, como lipólise, oxidação, proteólise, perda de peso e teor de umidade, que afetam o sabor, a textura e todas as outras propriedades físicas e químicas. As propriedades de barreira dos materiais de embalagem têm um grande impacto na vida útil do queijo. A embalagem de queijo requer troca de gases, porque o queijo consome oxigênio e libera CO₂, mas os materiais de embalagem devem ter baixa permeabilidade ao oxigênio para impedir o crescimento de microorganismos nocivos e a oxidação de gorduras. O queijo também deve evitar a evaporação da água e a oxidação induzida pela luz, a fim de prolongar a vida útil do queijo e evitar a deterioração causada pela oxidação da gordura (CHEN et al., 2019).
















4.5 Teste de vida de prateleira

A seguir serão apresentados os resultados obtidos no teste de vida de prateleira dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, onde os filmes previamente preparados foram dispostos de duas formas: acondicionados no ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e armazenados sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR), por um período de seis meses.

4.5.1 Análise visual

O aspecto visual dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, apresentado na Tabela 4.23, está relacionado à sua aparência no decorrer do tempo (seis meses) em que estiveram armazenados sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR). Inicialmente os filmes apresentaram-se translúcidos, homogêneos, contínuos e sem rachaduras. Os filmes da formulação S3G20Gel3Q apresentaram uma coloração levemente amarelada e os da formulação I10G50 e I10G50UV10 exibiram uma coloração transparente, não sendo observado encolhimento das amostras.

Tabela 4.23 Aspecto visual dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento sob refrigeração ($5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2 \%$ de UR) por um período de zero a seis meses.

Tempo (meses)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0			
1			
2			
4			
6			

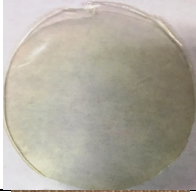
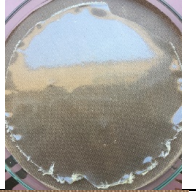



















No decorrer do tempo previsto para o ensaio de vida de prateleira (6 meses), os filmes da formulação S3G20Gel3Q foram se tornando frágeis e opacos, adquirindo uma coloração esbranquiçada a partir do terceiro mês de armazenamento. No sexto mês, essa coloração se acentuou. Já os filmes I10G50 e I10G50UV10, adquiriram uma coloração esbranquiçada apenas após o sexto mês de experimento. A alteração da cor de películas à base de soro de leite foi relatada como sendo principalmente associada ao escurecimento de proteínas de soro de leite e a vestígios de açúcares redutores de Maillard (MILLER; CHIANG; KROCHTA, 1997; TREZZA; KROCHTA, 2000). Comportamento semelhante ao observado no presente trabalho foi relatado por Osés e colaboradores (2009), ao avaliarem a instabilidade das propriedades mecânicas de filmes à base de proteína isolada de soro de leite durante o armazenamento em

diferentes umidades relativas ($50 \pm 5 \%$ e $75 \pm 5 \%$) à temperatura ambiente por um período de seis meses. À medida que o tempo de armazenamento foi aumentando, foi observado que os filmes ficaram parcialmente opacos, esbranquiçados e mais frágeis.

Após o segundo mês, algumas fissuras foram evidenciadas nas amostras dos filmes I10G50. Comportamento semelhante ocorreu nas amostras dos filmes I10G50UV10, porém as fissuras foram visualizadas após o quarto mês. Essas fissuras podem estar relacionadas à desidratação do filme atribuída à perda de plastificante, resultando na diminuição da capacidade de retenção de água dos filmes. A perda de umidade e a migração do plastificante para fora da matriz dos filmes já foram relatadas por diversos autores (ANKER; STADING; HERMANSSON, 2001; HERNÁNDEZ-MUÑOZ et al., 2004; OSÉS et al., 2009). Os plastificantes são moléculas de baixa massa molar que ajudam a melhorar a flexibilidade dos filmes, reduzindo as forças de coesão. Eles não reagem quimicamente, mas interagem fracamente com polímeros para diminuir as forças intermoleculares e as interações cadeia-cadeia. Moléculas de plastificantes pequenas, como o glicerol, apresentam alta eficiência plastificante, mas possuem baixa permanência na matriz devido à alta taxa de difusão e alta volatilidade (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). Vale ressaltar que em nenhum dos filmes selecionados foi visualizado crescimento microbiano durante o período de armazenamento.

Para os filmes armazenados no ambiente ($20 \pm 5 \text{ °C}$ e $77 \pm 3 \%$ de UR), o aspecto visual ao longo do período de seis meses é mostrado na Tabela 4.24. Assim como para as amostras armazenadas na sob refrigeração ($5 \pm 1 \text{ °C}$ e $23 \pm 2 \%$ de UR), os filmes foram adquirindo uma coloração esbranquiçada no decorrer do tempo. Porém, a descoloração foi acelerada na condição de maior temperatura de armazenamento, uma vez que as amostras se tornaram mais opacas nos primeiros dias de análise em comparação com as armazenadas sob refrigeração. Ket-on e colaboradores (2016) relataram que a taxa de desidratação e migração de glicerol para fora da matriz polimérica é acelerada pela temperatura de armazenamento.

Tabela 4.24 Aspecto visual dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente ($20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $77 \pm 3 \%$ de UR) por um período de zero a seis meses.

Tempo (meses)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			

No decorrer do período estabelecido para o teste de vida de prateleira, as amostras foram se deformando e a partir do quarto mês de análise, todas as amostras apresentaram crescimento microbiano visível. As amostras S3G20Gel3Q exibiram um crescimento microbiano mais

acentuado, apesar da incorporação da quitosana, que as amostras I10G50 e I10G50UV10, provavelmente em decorrência da presença de maiores teores de carboidratos no filme à base de soro de leite.

4.5.2 Ângulo de contato

Através da análise da variação do ângulo de contato no decorrer do tempo do teste de vida de prateleira (Tabela 4.25), é possível verificar que os filmes armazenados sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) apresentaram maior hidrofiliabilidade em comparação com os filmes armazenados à temperatura ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR). Esse comportamento pode estar relacionado à maior migração de glicerol nas amostras armazenadas no ambiente, conforme explicado anteriormente. A variação do ângulo de contato com o passar do tempo pode estar relacionado a alterações na superfície do filme (deformações sofridas, evidenciado através da análise visual).

Tabela 4.25 Ângulo de contato (°) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero seis meses.

Tempo (dias)	Ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR)			Sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR)		
	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0	91,5 ± 3,0 ^{d,e}	75,5 ± 1,1 ^d	78,5 ± 1,5 ^b	91,5 ± 3,0 ^a	75,5 ± 1,1 ^b	78,5 ± 1,5 ^b
7	124,8 ± 2,9 ^a	102,3 ± 1,8 ^a	99,1 ± 4,8 ^a	87,7 ± 1,8 ^a	84,3 ± 1,1 ^a	92,6 ± 1,8 ^a
14	104,9 ± 2,0 ^{c,d}	97,8 ± 2,8 ^{a,b}	103,8 ± 5,3 ^a	78,7 ± 1,4 ^{b,c}	83,5 ± 1,2 ^a	91,5 ± 1,7 ^a
30	107,5 ± 2,9 ^{b,c}	90,2 ± 1,6 ^{b,c}	84,5 ± 2,8 ^b	79,3 ± 2,1 ^{b,c}	86,2 ± 2,0 ^a	78,8 ± 0,4 ^b
45	98,0 ± 2,6 ^d	92,2 ± 0,9 ^b	84,0 ± 1,7 ^b	76,2 ± 1,5 ^c	81,6 ± 2,2 ^a	79,6 ± 4,0 ^b
60	94,4 ± 1,1 ^{d,e}	96,4 ± 0,9 ^{a,b}	72,1 ± 0,8 ^c	82,1 ± 3,3 ^b	83,8 ± 1,9 ^a	79,8 ± 2,4 ^b
90	92,9 ± 1,5 ^{d,e}	92,9 ± 3,1 ^b	69,5 ± 1,7 ^c	77,8 ± 1,6 ^{b,c}	82,3 ± 1,5 ^a	79,5 ± 2,6 ^b
120	90,5 ± 2,6 ^e	82,9 ± 3,1 ^{c,d}	74,8 ± 2,2 ^c	81,5 ± 1,4 ^{b,c}	84,3 ± 2,3 ^a	78,8 ± 0,6 ^b
150	105,4 ± 3,0 ^{c,d}	79,2 ± 4,3 ^d	59,1 ± 2,2 ^d	76,4 ± 1,0 ^c	84,1 ± 0,9 ^a	79,1 ± 2,0 ^b
180	113,1 ± 3,6 ^b	69,9 ± 3,9 ^d	59,5 ± 2,2 ^d	72,2 ± 1,5 ^d	83,2 ± 2,0 ^a	79,1 ± 1,0 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para as amostras armazenadas à temperatura ambiente, há uma tendência de diminuição do ângulo de contato com o decorrer do tempo. As análises de ângulo de contato para essas amostras foram afetadas pela modificação da superfície dos filmes, uma vez que foi observado um aumento de rugosidade com o passar do tempo. Além disso, o crescimento microbiano também acarretou mudanças na realização da análise. Para as amostras armazenadas sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR), houve uma mudança nas primeiras semanas de análise, sendo que nas análises sucessivas os resultados foram estáveis. Osés e colaboradores (2009) relataram que os filmes atingem o equilíbrio em relação às propriedades físicas e

mecânicas após uma semana de armazenamento. Logo, essas diferenças iniciais podem estar relacionadas a essa instabilidade inicial dos filmes.

4.5.3 Espessura

Alterações na espessura do filme podem ser indicativas de variações na estrutura de rede (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2015). No entanto, nenhuma variação substancial em tal parâmetro foi evidenciada após seis meses de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) (Tabela 4.26). Anker e colaboradores (2001) descreveram comportamento semelhante para filmes à base de soro de leite plastificado com glicerol e sorbitol, onde a perda de plastificante poderia ser muito pequena para afetar a espessura.

Tabela 4.26 Espessura (μm) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de seis meses.

Tempo (dias)	Ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR)			Sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR)		
	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0	67 ± 7^f	171 ± 3^b	219 ± 4^a	$67 \pm 7^{a,b}$	171 ± 3^d	219 ± 4^b
7	$95 \pm 3^{d,e}$	203 ± 5^a	206 ± 4^b	$72 \pm 7^{a,b}$	144 ± 4^c	$212 \pm 5^{b,c}$
14	$96 \pm 4^{c,d,e}$	202 ± 1^a	206 ± 3^b	79 ± 3^a	161 ± 1^a	$227 \pm 9^{a,b}$
30	94 ± 2^e	$158 \pm 4^{b,c}$	$184 \pm 4^{c,d}$	$67 \pm 6^{a,b}$	142 ± 2^c	203 ± 4^c
45	$96 \pm 3^{d,e}$	155 ± 3^c	175 ± 3^e	$67 \pm 10^{a,b}$	142 ± 2^c	$225 \pm 9^{a,b}$
60	$102 \pm 2^{b,c,d}$	153 ± 3^c	187 ± 1^c	58 ± 5^b	$146 \pm 4^{b,c}$	237 ± 6^a
90	$103 \pm 3^{b,c}$	154 ± 2^c	187 ± 2^c	$75 \pm 7^{a,b}$	$148 \pm 1^{b,c}$	240 ± 3^a
120	$102 \pm 2^{b,c,d}$	164 ± 2^b	$184 \pm 1^{c,d}$	$69 \pm 7^{a,b}$	$148 \pm 1^{b,c}$	$230 \pm 6^{a,b}$
150	108 ± 2^b	$159 \pm 1^{b,c}$	174 ± 3^e	$70 \pm 6^{a,b}$	152 ± 1^b	235 ± 8^a
180	140 ± 3^a	165 ± 3^b	$178 \pm 2^{d,e}$	$68 \pm 8^{a,b}$	$156 \pm 5^{a,b}$	237 ± 6^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para os filmes armazenados à temperatura ambiente, o comportamento foi oposto. Após seis meses de armazenamento, os filmes sofreram variações substanciais na espessura acompanhada por aumento de rugosidade e heterogeneidade. O mesmo comportamento foi observado por Olabarrieta e colaboradores (2006a) e Olabarrieta e colaboradores (2006b), ao avaliarem o comportamento de filmes à base de glúten no processo de envelhecimento por 120 dias a 50 % de umidade relativa e 23 °C. Durante o envelhecimento, os filmes apresentaram mudanças estruturais consideráveis, decorrente da migração do glicerol ou separação de fases glicerol/glúten. O processo de envelhecimento foi determinado por mudanças estruturais lentas, possivelmente envolvendo processos de desnaturação e agregação de proteínas.

4.5.4 Propriedades mecânicas

Mudanças nas propriedades mecânicas dos filmes foram evidenciadas durante o período de armazenamento, tanto à temperatura ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) quanto sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR), como mostra a Tabela 4.27 e 4.28. Para as amostras de I10G50 e I10G50UV10, houve uma diminuição do alongamento na ruptura (ϵ_b) e da tensão na ruptura (σ_b) nos primeiros dois meses, para ambas condições de armazenamento. Posteriormente, o valor permaneceu relativamente constante ou diminuiu suavemente. Os resultados gerais mostraram que os filmes se tornaram mais frágeis e menos flexíveis. Os filmes preparados com a formulação S3G20Gel3Q exibiram comportamento semelhante. O efeito contrário foi exposto por Ciannamea e colaboradores (2015), ao avaliar o comportamento de filmes à base de proteína concentrada de soja armazenados a 25 ± 2 °C e 65 ± 2 % de umidade relativa por um período de 90 dias. Os valores de tensão na ruptura e alongamento não variaram durante os primeiros dois meses de armazenamento, porém mudaram consideravelmente no 90º dia, podendo estar relacionado à perda de plastificante, reorganização estrutural e aumento da reticulação química (reação de Maillard).

Tabela 4.27 Alongamento na ruptura (%) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero a seis meses.

Tempo (dias)	Ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR)			Sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR)		
	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0	$6,6 \pm 1,2^g$	$46,3 \pm 13,5^a$	$13,6 \pm 1,3^b$	$6,6 \pm 1,2^f$	$46,3 \pm 13,5^a$	$13,6 \pm 1,3^a$
7	$46,5 \pm 1,6^a$	$26,7 \pm 1,4^b$	$49,7 \pm 2,3^a$	$86,0 \pm 4,2^a$	$38,4 \pm 0,6^b$	$8,7 \pm 0,6^b$
14	$44,2 \pm 1,5^{a,b}$	$17,1 \pm 0,9^{c,d}$	$15,5 \pm 0,2^b$	$83,3 \pm 1,7^{a,b}$	$29,2 \pm 0,6^c$	$7,1 \pm 0,3^{b,c}$
30	$37,0 \pm 2,6^{b,c}$	$18,4 \pm 0,3^c$	$14,7 \pm 1,6^b$	$77,5 \pm 0,8^{b,c}$	$15,0 \pm 1,5^{d,e}$	$4,0 \pm 0,2^{c,d}$
45	$31,9 \pm 1,6^{c,d}$	$14,4 \pm 1,7^{c,d,e}$	$17,1 \pm 1,4^b$	$76,5 \pm 1,7^{b,c}$	$14,5 \pm 1,6^{d,e}$	$2,6 \pm 0,3^d$
60	$27,9 \pm 1,3^{d,e}$	$13,7 \pm 1,7^{d,e}$	$18,2 \pm 1,5^b$	$78,9 \pm 1,3^{a,b,c}$	$15,0 \pm 1,7^{d,e}$	$4,6 \pm 1,4^{c,d}$
90	$24,2 \pm 1,9^e$	$13,3 \pm 0,6^{d,e}$	$14,6 \pm 1,5^b$	$76,8 \pm 1,9^{b,c}$	$11,4 \pm 1,7^e$	$5,0 \pm 1,0^{b,c,d}$
120	$14,4 \pm 3,4^f$	$14,5 \pm 1,0^{c,d,e}$	$14,6 \pm 0,6^b$	$73,5 \pm 1,7^{c,d}$	$18,4 \pm 0,9^d$	$4,7 \pm 0,5^{c,d}$
150	$14,2 \pm 0,9^f$	$12,4 \pm 0,5^e$	$14,5 \pm 1,7^b$	$67,4 \pm 1,0^d$	$15,8 \pm 1,4^{d,e}$	$5,7 \pm 2,0^{b,c,d}$
180	$5,2 \pm 0,7^g$	$2,9 \pm 0,8^f$	$14,7 \pm 1,7^b$	$38,4 \pm 1,4^e$	$14,9 \pm 0,5^{d,e}$	$7,4 \pm 0,6^{b,c}$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para as amostras de S3G20Gel3Q armazenadas à temperatura ambiente, houve uma diminuição do ϵ_b e um aumento da σ_b durante o período de tempo avaliado. Os maiores valores das propriedades de tração e redução da extensibilidade durante o armazenamento também podem estar relacionadas à perda do plastificante e evaporação de água (MILLER; CHIANG;

KROCHTA, 1997). Comportamento semelhante foi relatado por Ket-on e colaboradores (2016) e Osés e colaboradores (2009).

Tabela 4.28 Tensão de ruptura (MPa) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR) e sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR) por um período de zero a seis meses.

Tempo (dias)	Ambiente (20 ± 5 °C e 77 ± 3 % de UR)			Sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR)		
	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0	$5,9 \pm 0,9^a$	$0,5 \pm 0,2^{c,d}$	$0,9 \pm 0,1^d$	$5,9 \pm 0,9^a$	$0,5 \pm 0,2^c$	$0,9 \pm 0,1^a$
7	$2,3 \pm 0,0^a$	$2,2 \pm 0,0^a$	$3,8 \pm 0,4^a$	$2,8 \pm 0,0^b$	$1,9 \pm 0,1^a$	$1,3 \pm 0,1^a$
14	$1,4 \pm 0,1^b$	$1,4 \pm 0,3^b$	$3,3 \pm 0,4^a$	$2,1 \pm 0,0^d$	$0,9 \pm 0,1^b$	$1,3 \pm 0,1^a$
30	$2,6 \pm 0,1^a$	$0,8 \pm 0,1^c$	$2,8 \pm 0,5^{b,c}$	$2,2 \pm 0,1^{b,c,d}$	$1,0 \pm 0,0^b$	$1,2 \pm 0,2^a$
45	$1,5 \pm 0,2^b$	$0,6 \pm 0,1^{c,d}$	$1,7 \pm 0,1^{c,d}$	$2,5 \pm 0,1^{b,c,d}$	$0,9 \pm 0,1^b$	$0,9 \pm 0,0^a$
60	$1,1 \pm 0,1^b$	$0,5 \pm 0,0^{c,d}$	$1,3 \pm 0,3^{d,e}$	$2,6 \pm 0,2^{b,c}$	$1,0 \pm 0,0^b$	$1,0 \pm 0,0^a$
90	$1,3 \pm 0,1^b$	$0,4 \pm 0,0^{c,d}$	$1,3 \pm 0,0^{d,e}$	$2,6 \pm 0,1^{b,c,d}$	$0,9 \pm 0,0^b$	$0,7 \pm 0,1^a$
120	$1,4 \pm 0,2^b$	$0,3 \pm 0,0^d$	$0,6 \pm 0,1^{d,e}$	$2,8 \pm 0,1^b$	$0,8 \pm 0,0^{b,c}$	$0,8 \pm 0,0^a$
150	$1,3 \pm 0,0^b$	$0,2 \pm 0,1^d$	$0,5 \pm 0,0^e$	$2,8 \pm 0,2^{b,c,d}$	$0,8 \pm 0,1^{b,c}$	$0,7 \pm 0,3^a$
180	$1,3 \pm 0,1^b$	$0,2 \pm 0,1^d$	$0,3 \pm 0,0^e$	$1,6 \pm 0,1^c$	$0,6 \pm 0,1^c$	$0,8 \pm 0,0^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.5.5 Opacidade

Como tendência geral, a opacidade aumentou com o tempo para ambas condições de armazenamento, como apresentado na Tabela 4.29. Na literatura é relatado que os plastificantes aumentam a transparência da região visível, interferindo com as interações proteína-proteína (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2001). Portanto, a redução na transparência foi correlacionada com a perda de glicerol e umidade durante o armazenamento, como também pode estar associada à reação de Maillard.

Tabela 4.29 Opacidade (A_{600}/mm) dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 durante o armazenamento em ambiente ($20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $77 \pm 3 \%$ de UR) e sob refrigeração ($5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2 \%$ de UR) por um período de zero seis meses.

Tempo (dias)	Ambiente ($20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $77 \pm 3 \%$ de UR)			Sob refrigeração ($5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2 \%$ de UR)		
	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0	$1,3 \pm 0,1^f$	$0,2 \pm 0,0^d$	$0,2 \pm 0,0^c$	$1,3 \pm 0,1^f$	$0,2 \pm 0,0^b$	$0,2 \pm 0,0^b$
7	$1,5 \pm 0,4^f$	$0,3 \pm 0,0^c$	$0,3 \pm 0,1^b$	$1,1 \pm 0,0^e$	$0,4 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,0^f$
14	$2,9 \pm 0,1^e$	$0,3 \pm 0,0^c$	$0,3 \pm 0,0^b$	$1,2 \pm 0,0^f$	$0,3 \pm 0,1^{a,b}$	$0,5 \pm 0,1^f$
30	$3,9 \pm 0,3^d$	$0,4 \pm 0,1^{b,c}$	$0,3 \pm 0,0^b$	$2,2 \pm 0,1^{d,e}$	$0,7 \pm 0,2^a$	$0,4 \pm 0,1^{d,e}$
45	$3,7 \pm 0,2^d$	$0,4 \pm 0,1^{b,c}$	$0,4 \pm 0,1^b$	$2,1 \pm 0,0^e$	$0,6 \pm 0,2^a$	$0,4 \pm 0,1^e$
60	$4,0 \pm 0,2^d$	$0,4 \pm 0,1^{b,c}$	$0,4 \pm 0,0^b$	$2,2 \pm 0,0^e$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,4 \pm 0,1^e$
90	$5,9 \pm 0,3^c$	$0,4 \pm 0,1^{b,c}$	$0,3 \pm 0,1^b$	$2,3 \pm 0,0^d$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,1^d$
120	$6,4 \pm 0,1^c$	$0,4 \pm 0,0^{b,c}$	$0,3 \pm 0,1^b$	$2,8 \pm 0,1^c$	$0,5 \pm 0,1^a$	$0,2 \pm 0,1^c$
150	$7,4 \pm 0,3^b$	$0,7 \pm 0,2^b$	$0,4 \pm 0,1^b$	$3,5 \pm 0,1^b$	$0,5 \pm 0,1^c$	$0,2 \pm 0,1^b$
180	$9,4 \pm 0,3^a$	$2,0 \pm 0,2^a$	$1,5 \pm 0,5^a$	$4,3 \pm 0,1^a$	$0,6 \pm 0,0^d$	$0,3 \pm 0,0^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

É possível verificar que as amostras armazenadas à temperatura ambiente apresentaram um aumento de opacidade mais acentuado em comparação as amostras armazenadas sob refrigeração. Novamente, quanto maior a temperatura de armazenamento, maior a taxa de desidratação e migração de glicerol para fora da matriz polimérica. Além disso, as amostras de S3G20Gel3Q para ambas condições de armazenamento, exibiram um aumento mais considerável de opacidade quando comparadas às amostras I10G50 e I10G50UV10. Isso provavelmente é decorrente da maior suscetibilidade das amostras às reações de Maillard, uma vez que apresentam uma maior concentração de carboidratos.

4.5.6 Considerações sobre o tempo de armazenamento

A partir dos resultados apresentados, pode-se sugerir que os filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 podem ser armazenados sob refrigeração por período prolongado de estoque ou tempo de armazenamento. No entanto, a baixa temperatura de armazenamento pode induzir ao enfraquecimento das propriedades mecânicas dos filmes. Para o armazenamento nas condições ambiente, sugere-se um tempo de armazenamento mais curto, de no máximo de 4 meses.

4.6 Teste de envelhecimento acelerado

As amostras S3G30Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 foram submetidas ao envelhecimento acelerado por 80, 160, 240, 360 e 480 h de exposição, correspondendo a uma simulação de 2, 4, 6, 9 e 12 meses, respectivamente. As características das amostras foram

avaliadas com respeito às modificações na estrutura química, na perda de massa e no comportamento térmico.

4.6.1 Caracterização química

Na Figura 4.11 estão apresentados os espectros de FT-IR das amostras (a) S3G20Gel3Q, (b) I10G50 e (c) I10G50UV10, antes e após exposição ao envelhecimento acelerado por períodos de 80, 160, 240, 360 e 480 h.

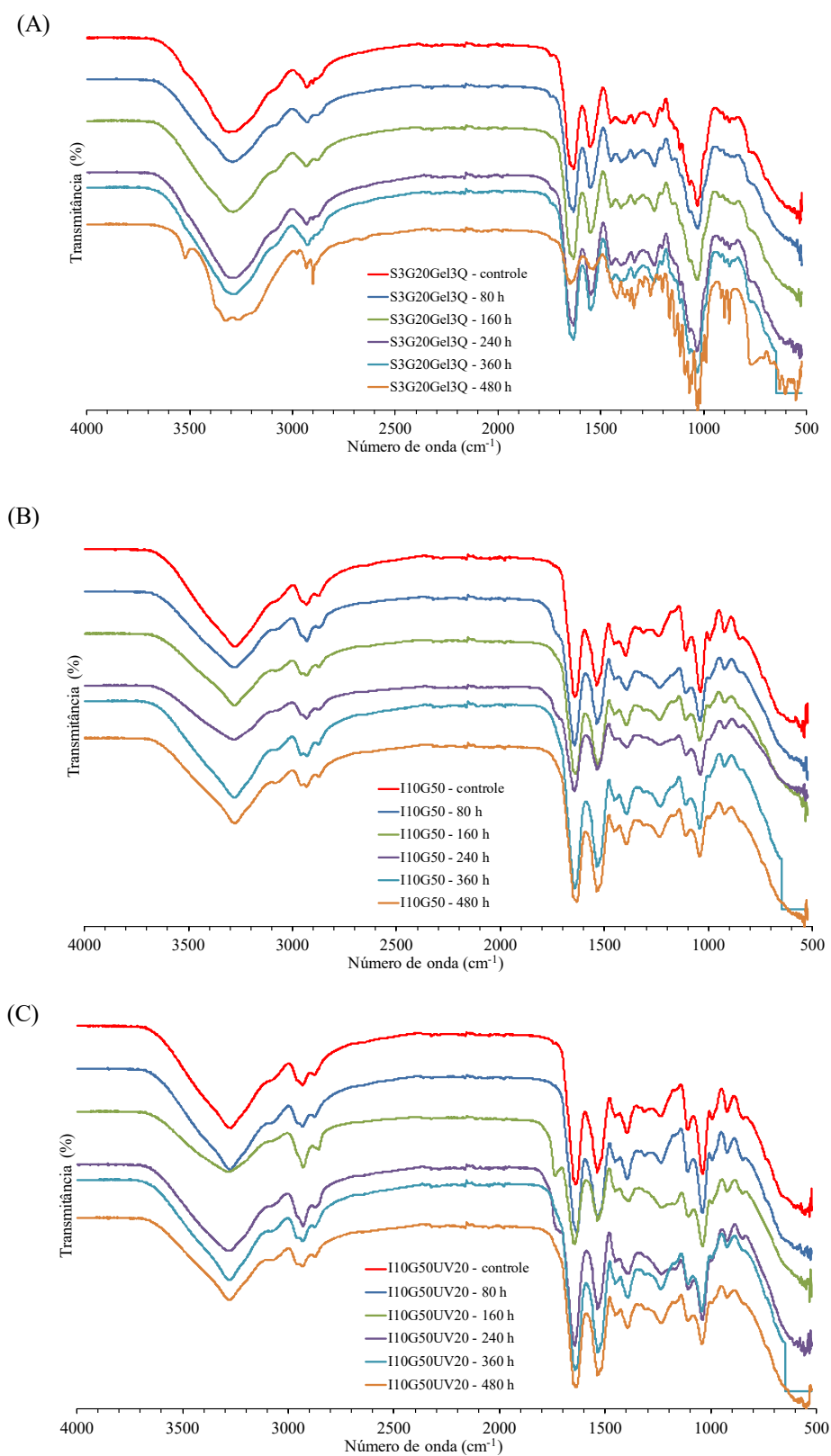


Figura 4.11 Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) dos filmes. (A) S3G20Gel3Q, (B) I10G50 e (C) I10G50UV20, antes e após exposição ao envelhecimento acelerado por períodos de 80, 160, 240, 360 e 480 h.

A estrutura dos filmes após o envelhecimento acelerado foi avaliada analisando a região espectral de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (amida). A banda amida I é composta pela superposição de várias

bandas de absorção relacionadas a diferentes estruturas secundárias de proteínas. O envelhecimento pareceu causar rearranjos conformacionais na fração proteica. A principal diferença espectral observada foi o incremento na intensidade e uma diminuição da amplitude da banda próxima a 1630 cm^{-1} para todas as amostras com o passar do tempo. Este resultado sugere que o envelhecimento promoveu a reorganização da estrutura secundária da fração proteica dos filmes e que a migração de glicerol leva a uma alteração na estrutura das proteínas. O glicerol, como a maioria dos álcoois usados como plastificantes de proteínas, é considerado um agente helicogênico, mesmo no caso de proteínas conhecidas por possuírem estruturas nativas não helicoidais, o que reduz o efeito hidrofóbico (SUBIRADE et al., 1998). O efeito helicogênico é uma característica comum da maioria dos álcoois usados como solventes para proteínas e as misturas hidroalcoólicas, geralmente usadas para estudar proteínas a baixas temperaturas, induzem estruturas secundárias helicoidais nas cadeias polipeptídicas. Portanto, a perda de glicerol pode ser o principal fator responsável pela conversão de outras estruturas secundárias. A menor amplitude dessa banda pode ser atribuída a um enfraquecimento das ligações H- entre as cadeias peptídicas (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2015). Para a amostra S3G20Gel3Q o incremento da banda próxima a 1630 cm^{-1} ocorreu até 360 h, sendo que houve uma redução de intensidade após 480 h, que pode estar relacionada à degradação do material.

4.6.2 Análise térmica

A Tabela 4.30 apresenta a faixa de temperatura de degradação, a temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima e o percentual de perda de massa em cada evento das amostras analisadas por TGA. As curvas de TGA das amostras S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, antes e após exposição ao envelhecimento acelerado, são apresentados no Apêndice C.

Tabela 4.30 Faixa de degradação, temperatura máxima de degradação (T_{max}) e perda de massa dos filmes antes e após exposição ao envelhecimento acelerado por períodos de 80, 160, 240, 360 e 480 h.

Amostra	Temperatura inicial – final (°C)	Temperatura máxima (°C)	Perda de massa (%)
S3G20Gel3Q-controle	250,60 – 383,20	290,24	86,85
S3G20Gel3Q-80 h	245,18 – 360,45	259,30	84,97
S3G20Gel3Q-160 h	245,15 – 373,19	291,03	88,23
S3G20Gel3Q-240 h	230,34 – 360,32	275,10	78,18
S3G20Gel3Q-360 h	216,66 – 412,27	316,04	77,05
S3G20Gel3Q-480 h	186,43 – 465,11	338,91	95,25
I10G50-controle	297,03 – 343,57	246,99	94,30
I10G50-80 h	271,96 – 332,07	271,16	53,10
I10G50-160 h	251,59 – 402,95	318,91	90,28
I10G50-240 h	266,61 – 405,14	317,06	82,55
I10G50-360 h	246,20 – 377,58	318,02	84,79
I10G50-480 h	208,09 – 389,22	331,60	93,75
I10G50UV10-controle	268,55 – 346,78	262,12	86,71
I10G50UV10-80 h	262,11 – 350,02	297,05	91,16
I10G50UV10-160 h	264,98 – 351,86	297,32	89,92
I10G50UV10-240 h	254,88 – 384,62	317,57	86,09
I10G50UV10-360 h	252,11 – 414,20	327,24	94,92
I10G50UV10-480 h	242,03 – 399,95	330,49	95,25

Com o aumento do tempo de exposição ao envelhecimento acelerado há uma diminuição da temperatura inicial de degradação. Essa diminuição pode estar associada aos processos de oxidação. Quanto mais baixa a temperatura de início de perda de massa, menor é a estabilidade de um material às condições do experimento (PAOLI, 2008). Desta forma, pode-se inferir que a amostra I10G50 apresentou uma maior estabilidade inicial e a amostra I10G50UV10 maior estabilidade final, sendo que a amostra S3G20Gel3Q foi a mais instável, provavelmente devido a maior presença de impurezas. O teor de resíduos finais (após 480 h) foi maior para o I10G50 em relação aos demais.

4.6.3 Considerações sobre o envelhecimento acelerado

A partir dos resultados apresentados, pode-se sugerir que o filme I10G50UV10 apresentou uma maior estabilidade no processo de envelhecimento acelerado, seguido do I10G50 e S3G20Gel3Q. Também pode-se inferir que o filme S3G20Gel3Q degradou após 360 h de exposição ao envelhecimento acelerado, o que corresponde a 9 meses.

4.7 Teste de biodegradabilidade

A seguir serão apresentados os resultados das análises de biodegradabilidade realizadas no solo simulado para os filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10.

4.7.1 Monitoramento do solo

As condições ideais do solo (meio) foram monitoradas de acordo com a norma ASTM G160-03. Essa norma indica um pH entre 6,5 a 7,5, sendo o pH monitorado neste estudo dentro deste limite; o pH é importante para a sobrevivência dos microrganismos, sendo os fungos os mais seletivos em relação a esse parâmetro (PAOLI, 2008). A umidade do meio foi outro parâmetro monitorado durante o período de maturação (3 meses), onde a norma estabelece o intervalo de 20 a 30 % como adequado. Os valores de umidade foram registrados semanalmente, conforme mostrado na Figura 4.12.

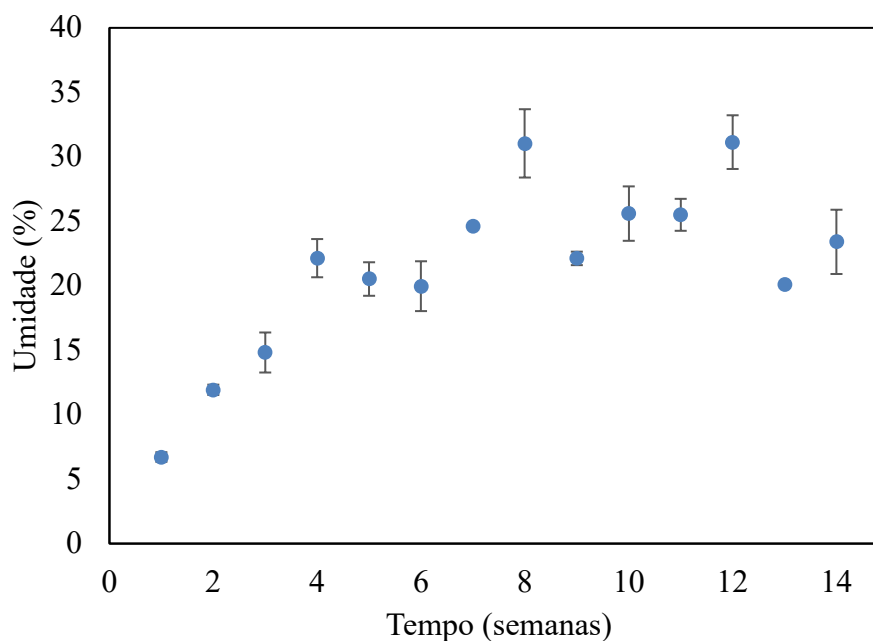


Figura 4.12 Monitoramento da umidade do solo simulado durante o período de maturação do solo.

A partir dos dados obtidos, observou-se que a umidade média do solo ficou próxima de 25 %, estando dentro do limite especificado pela norma. Os parâmetros pH, sólidos voláteis, carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total foram avaliados, antes e após o experimento de biodegradação. Os dados são apresentados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31 Parâmetros analisados do solo simulado, antes e após o experimento de biodegradação.

Ensaio	Metodologia utilizada	Solo inicial	Solo final
pH a 25°C	Boletim técnico nº 5 [LAPAM PE 035]	6,9	7,0
Sólidos voláteis (%)	SMEWW-Método 2540-G [LAPAM PE 033]	17,2	18,6
Carbono orgânico total (% em base seca)	Boletim técnico nº 5 – 2ª ed. [LAPAM PE 032]	6,3	8,4
Nitrogênio total (% em base seca)	Boletim técnico nº 5 – 2ª ed. [LAPAM PE 030]	0,3	0,3
Fósforo total (% em base seca)	SMEWW-Método 4500-P B e E [LAPAM PE 019]	0,2	0,2

Pela análise dos dados de pH observa-se que o solo preparado apresentou pH variando de 6,9 antes da inserção dos filmes no solo até 7,0 após a completa degradação, estando assim em conformidade com a norma ASTM G160-03.

Além do pH neutro, os microrganismos precisam de carbono, o qual servirá como fonte de energia, e de nitrogênio para a síntese de proteínas, sendo que a falta de algum destes elementos pode limitar a atividade microbiológica. Desta forma é importante considerar a relação C/N (carbono/nitrogênio) como fator de equilíbrio dos substratos. Observa-se que esta relação é de 18,0 no estágio inicial e 24,7 no final da exposição dos filmes ao solo simulado. O aumento desta relação está associado à composição das amostras, que são de natureza orgânica, ricas em compostos carbonados. Sendo, portanto, um forte indicativo da ocorrência do processo de biodegradação.

Assim como o carbono e o nitrogênio, o fósforo também pode ser considerado nutriente para os microrganismos. Com o passar do tempo, o fósforo deve ser consumido, permitindo com que as colônias de microrganismos se desenvolvam, resultando em um decréscimo no percentual desse composto.

O teor de sólidos voláteis permite verificar o grau de degradação da matéria carbonada, sendo que a redução deste parâmetro com o passar do tempo, indica a mineralização da massa orgânica até a sua transformação. Porém, no presente estudo, esse parâmetro apresentou uma elevação, o que pode estar relacionado à pequena quantidade de amostra utilizada e ao erro experimental (BRANDALISE, 2008).

4.7.2 Teste do algodão

O ensaio de resistência à tração, segundo norma ASTM D882-10 (2010), foi realizado em cinco corpos de prova 100 % algodão, com gramatura de 411 g m⁻², antes e após exposição

ao solo, após um período de cinco dias. A força máxima de resistência do algodão antes à exposição ao solo foi de 28,7 kgf e após cinco dias foi de 14,0 kgf e a tensão na ruptura foi de 14,7 MPa antes e 5,9 MPa no quinto dia.

Com base nesse resultado observa-se que o algodão perdeu aproximadamente 50 % de suas propriedades. Segunda a norma ASTM G160-03 (2003), uma perda de 50 % de resistência à tração do algodão após três meses de maturação do solo significa que o mesmo está em condições adequadas para o início dos testes de degradação.

4.7.3 Avaliação da biodegradabilidade dos filmes

Durante o período de realização do teste de biodegradabilidade, os parâmetros de temperatura e umidade foram monitorados diariamente para as amostras S3G20Gel3Q e semanalmente para as amostras I10G50 e I10G50UV10, em função do tempo de degradação observado para cada amostra, conforme dados apresentados na Figura 4.13.

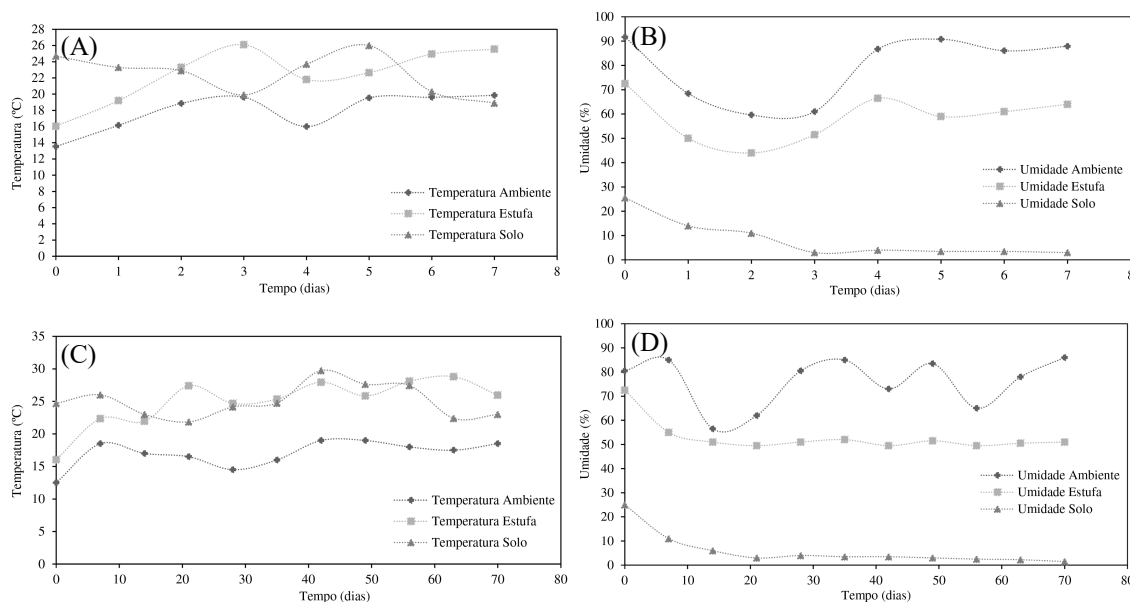


Figura 4.13 Monitoramento da temperatura e umidade durante a realização dos testes de biodegradabilidade. (A) Temperatura média ambiente, estufa e solo para os filmes S3G20Gel3Q, (B) umidade média ambiente, estufa e solo para o filme S3G20Gel3Q, (C) temperatura média ambiente, estufa e solo para os filmes I10G50 e I10G50UV10 e (D) umidade média ambiente, estufa e solo para os filmes I10G50 e I10G50UV10.

Conforme observado na Figura 4.13, durante o período de exposição das amostras S3G20Gel3Q, obteve-se temperaturas variando de 9 °C a 26 °C no ambiente (cidade de Caxias do Sul), de 9,1 °C a 35,8 °C no local em que as amostras ficaram armazenadas (estufa agrícola) e de 18,6 °C a 26,5 °C no meio utilizado (solo simulado). Em relação à umidade, houve variação de 31 % a 99 % no ambiente, de 15 % a 96 % no local de armazenamento e de 1 % a 27 % no meio utilizado.

Para as amostras I10G50 e I10G50UV10, houve variação da temperatura ambiente de 7 °C a 29 °C, de 5,6 °C a 48 °C na estufa e de 21,2 °C a 30,5 °C no meio utilizado. Em relação a umidade, obteve-se variações de 31 % a 99 % no ambiente, 15 % a 96 % na estufa e 1 % a 32 % no meio utilizado.

4.7.3.1 Análise visual

O aspecto visual dos filmes S3G20Gel3Q durante o período estabelecido para o teste de biodegradabilidade está apresentado na Figura 4.14.

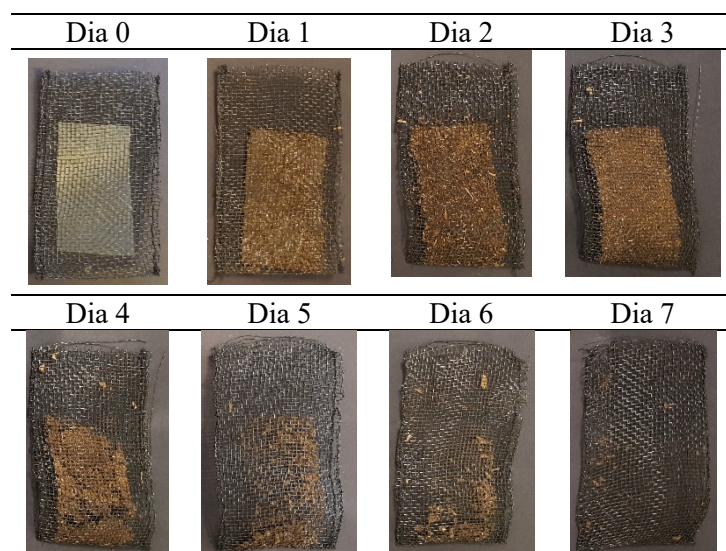


Figura 4.14 Imagens obtidas diariamente dos filmes S3G20Gel3Q durante o teste de biodegradabilidade.

De acordo com as imagens apresentadas, definiu-se o dia 0 sendo como sendo o dia inicial da avaliação das amostras, ligeiramente antes de serem colocadas no meio preparado e o dia 7 relacionado ao último dia no qual foi possível realizar as análises com os filmes e avaliar a sua integridade. Em função de sua alta hidrofiliçidade, não foi possível realizar a etapa de lavagem das amostras conforme orienta a norma ASTM G160-03, sendo assim, o excesso de solo aderido na superfície das amostras foi removido com auxílio de pincel para posterior análise. A presença de solo na amostra justifica a alteração de coloração das amostras do dia 0 para o dia 1.

Mudanças visuais na superfície das amostras, como poros ou fissuras, fragmentação, mudança da coloração, entre outras, não provam a presença de um processo de degradação biológica do ponto de vista metabólico, mas em compensação, podem ser considerados como primeiros sinais de ataque de microrganismos na amostra (SHAH et al., 2008). Desta forma, pode-se observar que os primeiros sinais de ataque de microrganismos para o filme S3G20Gel3Q ocorreu a partir do dia 4, onde é possível identificar a presença de fissuras

acompanhadas de alteração de coloração. Durante o teste, os filmes também absorveram água, perdendo sua forma inicial. A deterioração visual das amostras evidencia a susceptibilidade dos filmes à degradação e, por isso, eles podem ser classificados como materiais biodegradáveis.

Li e Chen (2000) ao estudarem o efeito da degradação biológica em filmes à base de proteína concentrada do soro de leite (WPC) e proteína isolada do soro de leite (WPI) concluíram que, quando submetidos ao processo de compostagem, os filmes de WPC degradaram-se mais rapidamente do que os filmes de WPI nas condições examinadas, o que sugere que a taxa de biodegradação está associada à composição dos materiais formadores de filme e à extensão da reticulação covalente nos filmes de proteína resultantes. O filme à base de WPC iniciou a degradação após dois dias de análise e o à base de WPI após sete dias, apresentando uma perda de mais de 80 % dos sólidos totais, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Campo e colaboradores (2017) avaliaram a biodegradabilidade de resíduos de cápsulas de gelatina através da exposição dos filmes ao solo. Após 15 dias, todas as amostras reduziram 68 % da sua massa inicial. Essa perda foi atribuída principalmente à lixiviação de compostos de baixa massa molar, como o glicerol. Produtos de degradação de gelatina e glicerol podem eventualmente ser adsorvidos pelo solo, sendo metabolizados por micorganismos.

Para os filmes I10G50, o comportamento do aspecto visual no decorrer do tempo do teste de biodegradabilidade é apresentado na Figura 4.15.

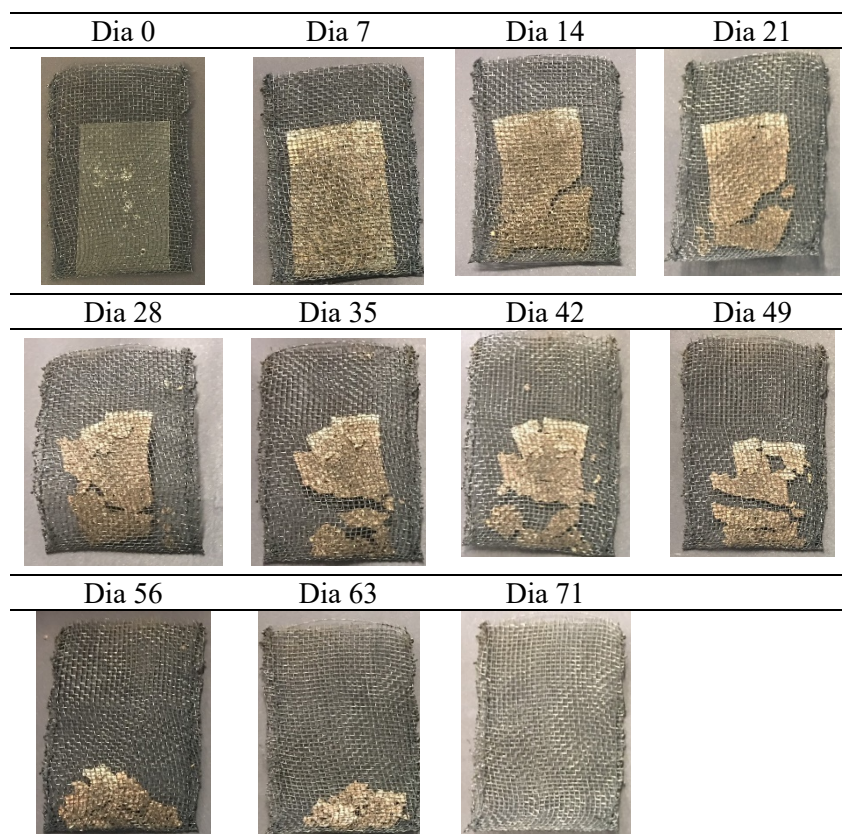


Figura 4.15 Imagens obtidas semanalmente dos filmes I10G50 durante o teste de biodegradabilidade.

Da mesma forma que os filmes S3G20Gel3Q, definiu-se o dia 0 sendo como sendo o dia inicial e o dia 71 relacionado ao último dia. As amostras também não foram lavadas, sendo o excesso de solo removido. Para esse filme, o início da degradação também ocorreu após o dia 4, em decorrência do aparecimento de fissuras e pequena alteração da cor. Porém o processo de degradação ocorreu mais lentamente que nos filmes S3G20Gel3Q e se prolongou por 71 dias, provavelmente em decorrência da composição dos filmes. Os filmes também absorveram água, perdendo sua forma inicial.

O comportamento do aspecto visual dos filmes I10G50UV10 no decorrer do teste de biodegradabilidade é exibido na Figura 4.16.

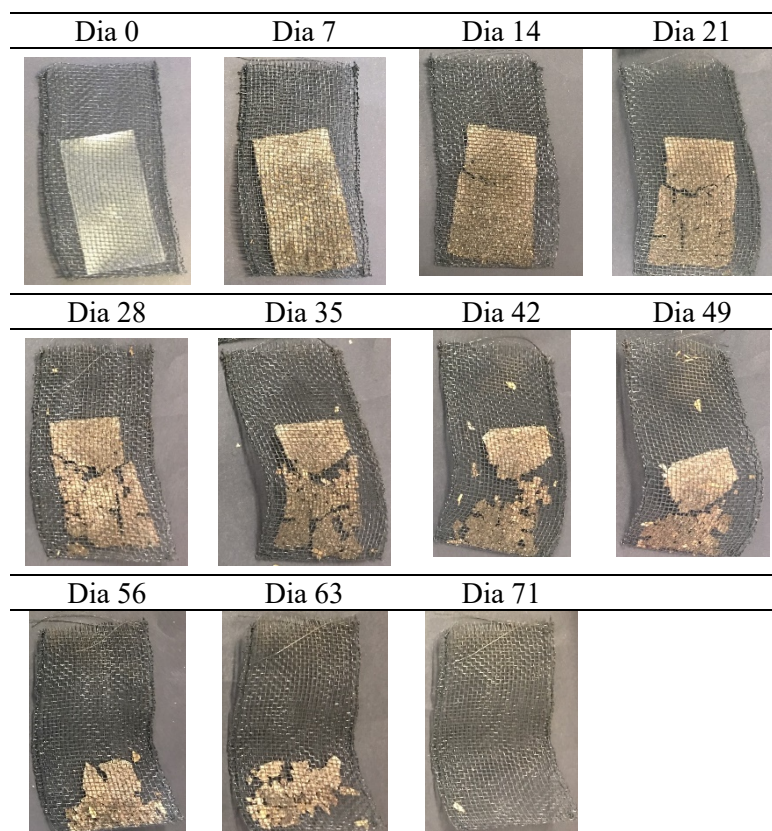


Figura 4.16 Imagens obtidas semanalmente dos filmes I10G50UV10 durante o teste de biodegradabilidade.

Da mesma forma que para os demais filmes, definiu-se o dia 0 como sendo o dia inicial e o dia 71 relacionado ao último dia. As amostras também não foram lavadas, sendo o excesso de solo removido com auxílio de pincel. Somente após o dia 14 foi possível observar os primeiros sinais de degradação, pelo aparecimento de fissura e alteração de cor. Assim como o filme I10G50, a degradação se prolongou por 71 dias, mostrando que a incorporação de OSU não interferiu na biodegradabilidade das amostras.

4.7.3.2 Perda de massa

Diariamente, os filmes S3G20Gel3Q foram pesados logo após a retirada do excesso de solo da superfície e os filmes I10G50 e I10G50UV10 foram pesados semanalmente. Os resultados de perda de massa para os filmes estão apresentados na Figura 4.17.

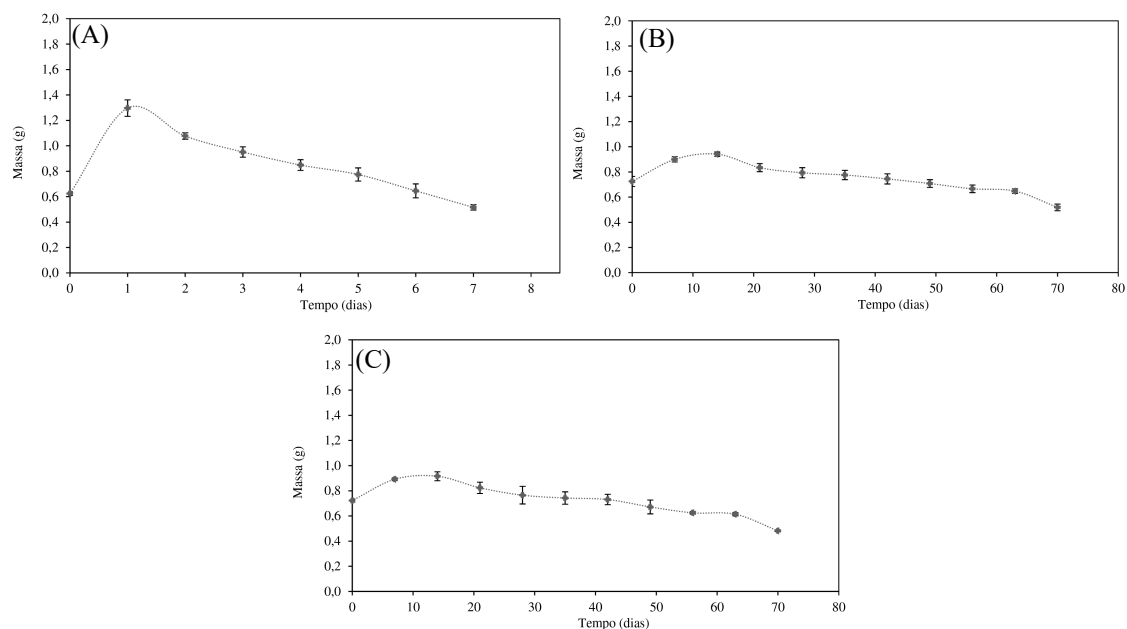


Figura 4.17 Monitoramento das massas dos filmes durante o experimento de degradação. (A) Variação diária da massa do filme S3G20Gel3Q, (B) variação semanal da massa do filme I10G50 e (C) variação semanal da massa do filme I10G50UV10.

Pela análise dos resultados é possível observar que houve um aumento significativo de massa para todas as amostras expostas no solo simulado no início do experimento. Para o filme S3G20Gel3Q o aumento foi mais expressivo e iniciou no primeiro dia de análise, enquanto para os filmes I10G50 e I10G50UV10, o aumento de massa iniciou na primeira semana de análise e teve seu pico na segunda semana. Este comportamento pode estar associado à agregação de solo à superfície do filme e à absorção de umidade. Estes filmes apresentam caráter hidrofílico e tem a tendência de absorver umidade presente no meio em que está exposto e, conseqüentemente, agrupar na sua superfície quantidades significativas de solo. Como o ataque por microrganismos deve ocorrer sempre na superfície do polímero, o início da degradação por hidrólise pode ser facilitado pelo aumento da hidrofiliicidade superficial do polímero. De um modo geral, a hidrólise enzimática de um polímero vai depender da hidrofiliicidade da cadeia polimérica (PAOLI, 2008).

De acordo com Paoli (2008) a biodegradação de um determinado material ocorre quando ele é usado como nutriente por um determinado conjunto de microrganismos (bactérias, fungos ou algas) que existe no meio ambiente onde o material vai ser degradado. Para que essa colônia de microrganismos cresça usando o material como nutriente é necessário que os microrganismos produzam as enzimas adequadas para quebrar algumas das ligações químicas da cadeia principal do polímero. A velocidade de crescimento da colônia de microrganismos vai determinar a velocidade com a qual o material está sendo biodegradado. Isso sugere que,

em decorrência do filme S3G20Gel3Q apresentar maior concentração de carboidratos em sua composição que os demais filmes, ele foi mais suscetível à biodegradação, apesar da incorporação de quitosana, o que corrobora com a mais rápida degradação deste material.

Quando a quantidade de solo junto ao filme é saturada, observa-se uma tendência de redução das massas em todas as amostras, adquirindo um comportamento decrescente. A perda de massa de filmes expostos no solo é considerada um indicador de degradação (CAMPO et al., 2017). As diferentes taxas de biodegradação dos filmes sugerem o impacto da natureza dos materiais que compõem os filmes em sua resistência à degradação microbológica (LI; CHEN, 2000).

4.7.3.3 Caracterização química

Os espectros de FT-IR dos filmes antes do processo de biodegradação e de pedaços de filme obtidos antes de sua completa biodegradação estão apresentados na Figura 4.18.

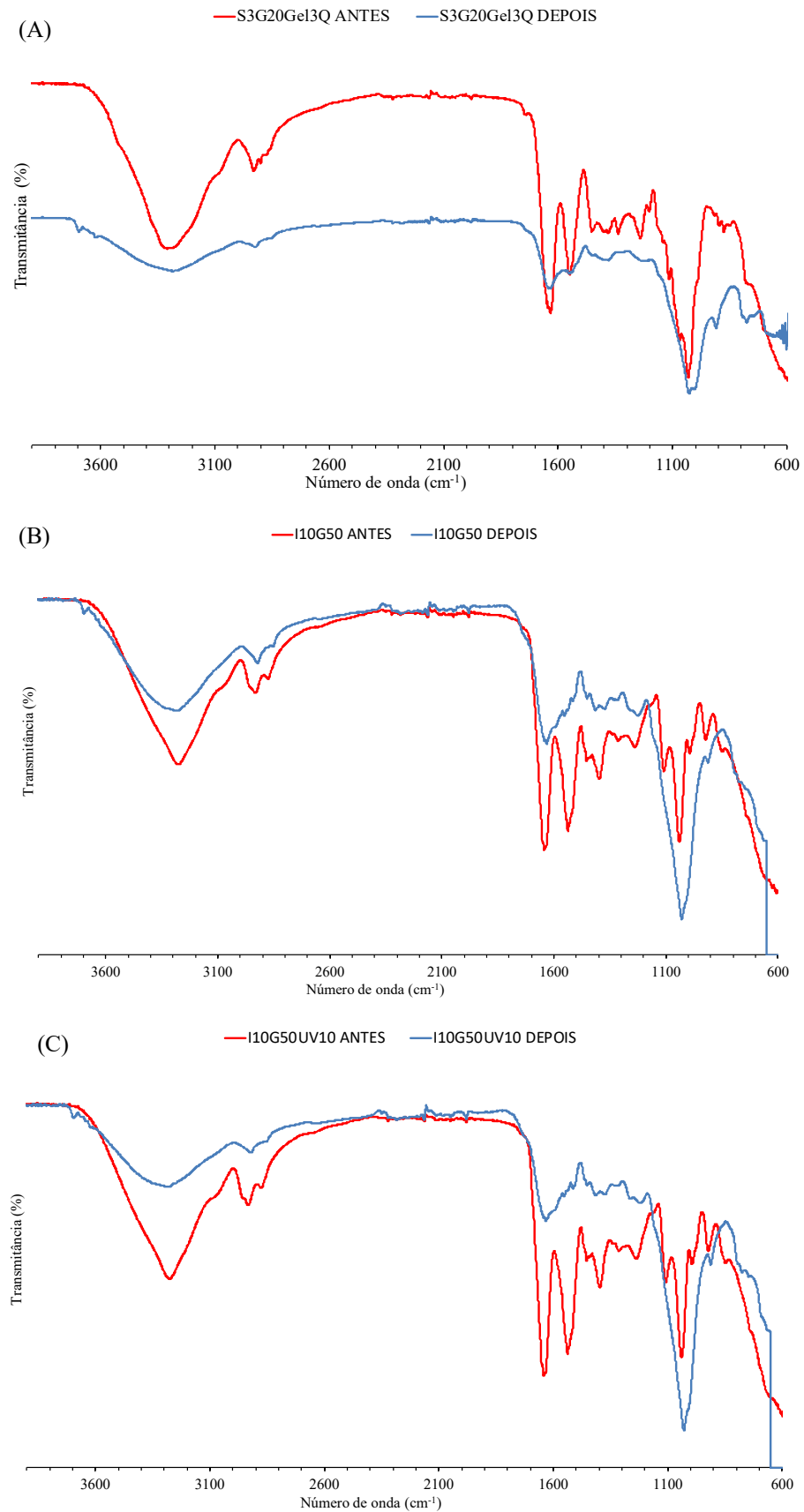


Figura 4.18 Espectros de FTIR dos filmes antes e após exposição ao solo simulado. (A) S3G20Gel3Q, (B) I10G50 e (C) I10G50UV10.

A análise da Figura 4.18 permite concluir que todos os filmes apresentaram redução da intensidade das bandas na região espectral de 3600-3000 cm^{-1} e nas regiões próximas a 1630, 1550 e 1230 cm^{-1} , correspondendo aos grupos funcionais amida I, amida II e amida III, respectivamente (PEREDA et al., 2011). Essa redução das bandas pode estar relacionada à degradação biológica ocorrida ou desintegração/quebra das ligações químicas. Lv e colaboradores (2018) também observaram a alteração dos grupos funcionais de compósito de amido/PLA e relataram que a intensidade das bandas características mudou em determinada faixa após a degradação do solo, indicando a biodegradação heterogênea do material. Após a exposição ao solo simulado, todas as amostras apresentaram aumento da intensidade da banda próxima a 1029 cm^{-1} , podendo estar relacionada à presença de vibrações de estiramento de C-O (HARUN-OR-RASHID et al., 2016).

4.7.4 Considerações sobre a biodegradabilidade dos filmes

A partir dos resultados apresentados neste item, pode-se sugerir que as três formulações avaliadas S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 são biodegradáveis, sendo que o filme S3G20Gel3Q exibiu a mais rápida degradação (uma semana) devido a sua composição, apresentando uma menor espessura e maior solubilidade, além de apresentar uma perda de massa mais rápida.

4.8 Aplicação dos filmes em alimento

A seguir serão apresentados os resultados das análises direta e indireta de aplicação dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 em alimento. Para este trabalho devido à natureza dos filmes foi escolhido como alimento teste o queijo minas frescal.

4.8.1 Análise direta

As amostras de queijo minas frescal foram submetidas à aplicação direta foram avaliadas por análises microbiológicas, perda de massa, acidez titulável, pH e aspecto visual.

4.8.1.1 Análise microbiológica

A análise microbiológica avaliou quatro diferentes agentes patológicos, coliformes termotolerantes, *Estafilococos* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e bolores e leveduras, manifestando tanto a presença quanto a ausência desses agentes. A norma RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA (BRASIL, 2001) determina os padrões microbiológicos para alimentos.

Na Tabela 4.32 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas das amostras de queijo minas frescal no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2\%$ de UR). A amostra controle é considerada o queijo minas frescal no dia 0 e a amostra sem recobrimento é o queijo sem cobertura filmogênica.

Tabela 4.32 Análise microbiológica das amostras de queijo minas frescal sem e com recobrimento utilizando os filmes selecionados e por plástico comercial, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2\%$ de UR).

Amostra	Coliformes termotolerantes (UFC/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Salmonella spp. (em 25 g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
Amostra controle	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,3 \times 10^3$
Sem recobrimento-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,3 \times 10^3$
Sem recobrimento-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,1 \times 10^2$
Sem recobrimento-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,1 \times 10^3$
S3G20Gel3Q-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,3 \times 10^2$
S3G20Gel3Q-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,0 \times 10^1$
S3G20Gel3Q-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
I10G50-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$3,5 \times 10^2$
I10G50-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
I10G50-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
I10G50UV10-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	Ausência	$1,1 \times 10^3$
I10G50UV10-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
I10G50UV10-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$< 1,0 \times 10^1$
Plástico filme-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,5 \times 10^3$
Plástico filme-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^1$	Ausência	$1,1 \times 10^4$
Plástico filme-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$8,4 \times 10^4$

Para coliformes a 45°C , o padrão determinado pela norma é de 102 UFC/g e para a *Salmonella* spp. o padrão é a ausência em 25 g. Partindo desses valores, pode-se perceber que em todas as amostras a quantidade de coliformes termotolerantes foi sempre inferior a $1,0 \times 10^1$ UFC/g e não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em 25 g para nenhuma amostra, portanto, as condições microbiológicas para estes agentes estão adequadas.

Os estafilococos são designados em 5×10^3 UFC/g, pela mesma norma. Com base nos dados apresentados na Tabela 4.32, é possível verificar que todas as amostras apresentaram valores dentro do limite estabelecido pela norma, mesmo após o prazo de validade do alimento de 5 dias, estabelecido pelo fornecedor. As amostras cobertas com plástico apresentaram maior

presença de estafilococos no sexto dia, mas ainda dentro dos limites estabelecidos pela norma, provavelmente em decorrência da maior umidade da amostra.

Para os valores de bolores e leveduras, foram consideradas as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001, que estabelece um valor limite de acordo com a umidade do produto. Para queijos que apresentam alto teor de umidade, como o queijo minas frescal, foi estabelecido um valor aceitável de até 5×10^3 UFC/g de coliformes termotolerantes. Durante o período completo de 10 dias em que ocorreram as análises nenhuma amostra ultrapassou o valor estabelecido, exceto o plástico filme comercial que apresentou maior presença de bolores e leveduras. Isso pode estar relacionado com a umidade, uma vez que ela se manteve maior nas amostras recobertas com plástico comercial. As amostras cobertas com plástico apresentaram valores superiores ao limite estabelecido pela norma nos dias 6 e 10 ($1,1 \times 10^4$ UFC/g e $8,4 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente).

Di Pierro e colaboradores (2011) avaliaram a extensão da vida útil de queijo ricota recoberto com uma película comestível de quitosana/proteína de soro de leite, armazenada sob atmosfera modificada a 4 °C. Durante os 30 dias de análise, o limite de microrganismos estabelecido não foi atingido pelas amostras revestidas com a película, sendo possível afirmar que o revestimento foi eficaz para prolongar a vida útil do queijo ricota. Wagh e colaboradores (2014) ao estudar a aplicação de diferentes embalagens à base de proteínas de leite apontaram que, a partir dos dados microbiológicos, pode-se concluir que os filmes proteicos foram eficazes em restringir o crescimento de microrganismos deteriorantes, o que estendeu o prazo de validade do queijo cheddar durante o armazenamento (30 dias).

4.8.1.2 Perda de massa do alimento

Os resultados da análise de perda de massa do alimento recoberto com os filmes estão apresentados na Figura 4.19 a seguir.

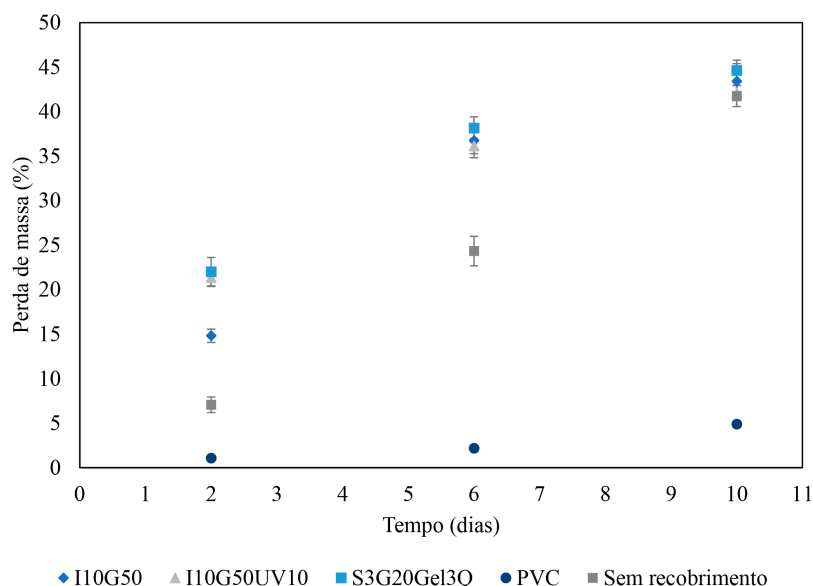


Figura 4.19 Perda de massa das amostras de queijo minas frescal no teste de recobrimento direto com os filmes selecionados e com filme à base de PVC, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Observa-se que em todos os casos, a perda de massa aumentou linearmente com o tempo de armazenamento, possivelmente devido ao movimento contínuo da umidade do queijo para o ambiente circundante (ZHONG; CAVENDER; ZHAO, 2014). Geralmente, os queijos revestidos apresentam menor perda de massa em relação aos queijos não revestidos (BERMÚDEZ-AGUIRRE; BARBOSA-CÁNOVAS, 2010). No entanto, no presente estudo, a perda de massa do queijo revestido foi maior do que queijo não revestido. Esse fato pode ser em decorrência de que quando os revestimentos foram aplicados, eles ainda estavam úmidos e a umidade dos queijos revestidos era significativamente maior do que a dos queijos não revestidos, essencialmente devido à presença de água no próprio revestimento. Durante o armazenamento, evaporou-se a umidade tanto do revestimento como do queijo e a perda de massa do queijo revestido foi conseqüentemente aumentada. O mesmo comportamento foi observado por (ZHONG; CAVENDER; ZHAO, 2014). A maior perda de massa foi apresentada pelos filmes à base de soro de leite, podendo estar relacionada à maior solubilidade desses filmes em comparação aos demais. A menor porcentagem de variação de massa foi observada no plástico filme, estando abaixo de 5 %.

4.8.1.3 Acidez total titulável

Na Figura 4.20 estão exibidos os resultados obtidos para a análise de acidez total titulável para as amostras de queijo minas frescal revestidas com as soluções filmogênicas I10G50, I10G50UV10, S3G20Gel3Q, filme de PVC e sem revestimento.

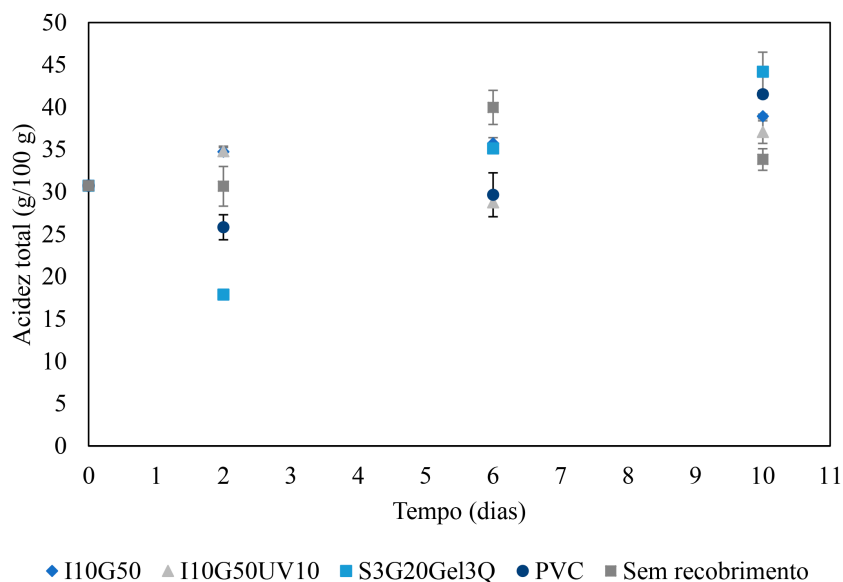


Figura 4.20 Acidez total titulável das amostras de queijo Minas Frescal no teste de recobrimento com as soluções filmogênicas I10G50, I10G50UV10, S3G20Gel3Q, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

A acidez total titulável (TA) aumentou linearmente durante os 10 dias de armazenamento para todas as amostras. O aumento da acidez provavelmente está associado à produção de ácido orgânico, principalmente em decorrência do aumento de microrganismos (Tabela 4.30), o que sugere a presença de bactérias produtoras de ácido lático. A máxima TA foi observada quando ocorreu a maior presença de microrganismos. O mesmo comportamento foi observado por Di Pierro e colaboradores (2011). Entretanto, o aumento máximo na TA foi observado nas amostras sem recobrimento. O aumento da TA sugere que a atividade de enzimas produzidas internamente, responsáveis pelo desenvolvimento da textura e do sabor durante o amadurecimento, seria mais ativa no controle (WAGH et al., 2014).

4.8.1.4 pH

Os valores de pH das amostras de queijo Minas Frescal revestidas com as soluções filmogênicas I10G50, I10G50UV10, S3G20Gel3Q, com filme de PVC e sem revestimento, durante o armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR), por um período de 10 dias estão apresentados na Figura 4.21.

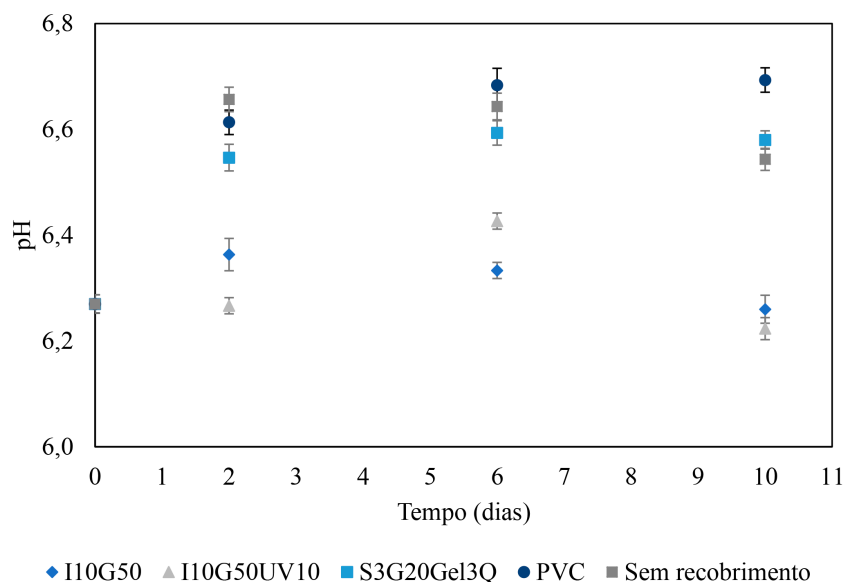


Figura 4.21 pH das amostras de queijo Minas Frescal no teste de recobrimento com as soluções filmogênicas I10G50, I10G50UV10, S3G20Gel3Q, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Os valores de pH permaneceram praticamente constantes do dia 2 até o dia 6. No dia 10 foi observado uma pequena queda deste parâmetro, o que pode estar relacionado à presença de ácido lático produzida por microrganismos (*Lactobacillus* spp.), aminoácidos ácidos e formação de ácidos graxos livres devido à proteólise e lipólise (DI PIERRO et al., 2011). O pH se manteve praticamente constante para as amostras revestidas com os filmes I10G50 e I10G50UV10, para as amostras revestidas com S3G20Gel3Q houve um aumento do pH a partir do dia 2, o que pode estar relacionado à composição do revestimento (que define suas propriedades) bem como a sua perda de massa mais acentuada. O aumento do pH para o revestimento S3G20Gel3Q foi inferior ao observado para as amostras com filme de PVC e sem recobrimento.

4.8.1.5 Análise visual

A análise visual das amostras de queijo Minas Frescal recobertas com as soluções filmogênicas S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 estão apresentadas na Tabela 4.33, as amostras sem recobrimento e cobertas com PVC estão apresentadas na Tabela 4.34.

Tabela 4.33 Aspecto visual das amostras de queijo minas frescal no teste de recobrimento direto pelas soluções filmogênicas S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).



















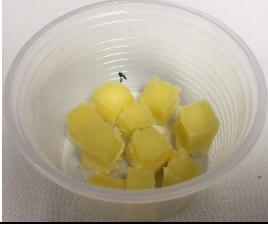
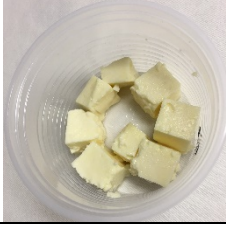
Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0			
2			
6			
10			

Tabela 4.34 Aspecto visual das amostras de queijo minas frescal com recobrimento direto pelas soluções filmogênicas S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração ($5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $23 \pm 2 \%$ de UR).

Tempo (dias)	Sem recobrimento	PVC
0		
2		
6		
10		

A fim de eliminar o efeito da luz natural, todas as amostras foram fotografadas no mesmo local. A superfície do queijo foi coberta pelos revestimentos usando o método de imersão (Tabela 4.31). Após o filme ser formado, todas as superfícies do queijo pareciam lisas e homogêneas. Após 2 dias, as amostras de queijo adquiriram coloração amarelada, com exceção do filme revestido com filme de PVC (Tabela 4.32). Com o passar dos dias a coloração amarelada se intensificou e as amostras foram se tornando secas e rígidas, o que pode estar relacionado à perda de umidade e ao processo de oxidação. O amarelamento das amostras também pode estar relacionado com a reação de Maillard.

Ao término de 10 dias, as amostras revestidas com filme de PVC apresentaram sinais claros de deteriorização, como odor azedo e aparência rançosa. Porém, para as amostras revestidas com S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 e sem revestimento, não foram detectadas diferenças na aparência visual, textura e odor, por inspeção visual.

4.8.2 Análise indireta

As amostras da aplicação indireta S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 foram submetidas às mesmas análises realizadas para o teste com aplicação direta. A discussão dos resultados será baseada nos resultados obtidos na análise direta, como comparação.

4.8.2.1 Análise microbiológica

Na Tabela 4.33 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas das amostras de queijo minas frescal com aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tabela 4.35 Análise microbiológica das amostras de queijo minas frescal com aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, de filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Amostra	Coliformes termotolerantes (UFC/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Salmonela spp. (em 25 g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
Amostra controle	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,3 \times 10^3$
Sem recobrimento-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,3 \times 10^3$
Sem recobrimento -6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,1 \times 10^2$
Sem recobrimento-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,1 \times 10^3$
S3G20Gel3Q-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$8,1 \times 10^2$
S3G20Gel3Q-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	Ausência	$4,1 \times 10^3$
S3G20Gel3Q-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	Ausência	$5,7 \times 10^3$
I10G50-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,9 \times 10^3$
I10G50-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	Ausência	$1,4 \times 10^3$
I10G50-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,3 \times 10^4$
I10G50UV10-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$8,0 \times 10^1$
I10G50UV10-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$1,0 \times 10^1$
I10G50UV10-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$4,8 \times 10^2$
Plástico filme-2 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	Ausência	$2,5 \times 10^3$
Plástico filme-6 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^1$	Ausência	$1,1 \times 10^4$
Plástico filme-10 dias	$< 1,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$	Ausência	$8,4 \times 10^4$

Assim como as amostras de queijo minas frescal submetidas ao revestimento direto, todas as amostras submetidas à aplicação indireta, no decorrer dos 10 dias, apresentaram os valores dentro do limite estabelecido pela legislação para os coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp. Porém, após o dia 6 e 10, as amostras cobertas com S3G20Gel3Q e plástico filme exibiram valores de bolores e leveduras superiores aos limites estabelecidos pela legislação. Isso pode ser um indicativo de deterioração da amostra

de alimento. Em comparação com a aplicação direta, as amostras S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 revelaram valores superiores de coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, bolores e leveduras, mas dentro dos limites estabelecidos pela legislação.

4.8.2.2 Perda de massa do alimento

Na Figura 4.22 estão apresentados os resultados de perda de massa do alimento com aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento.

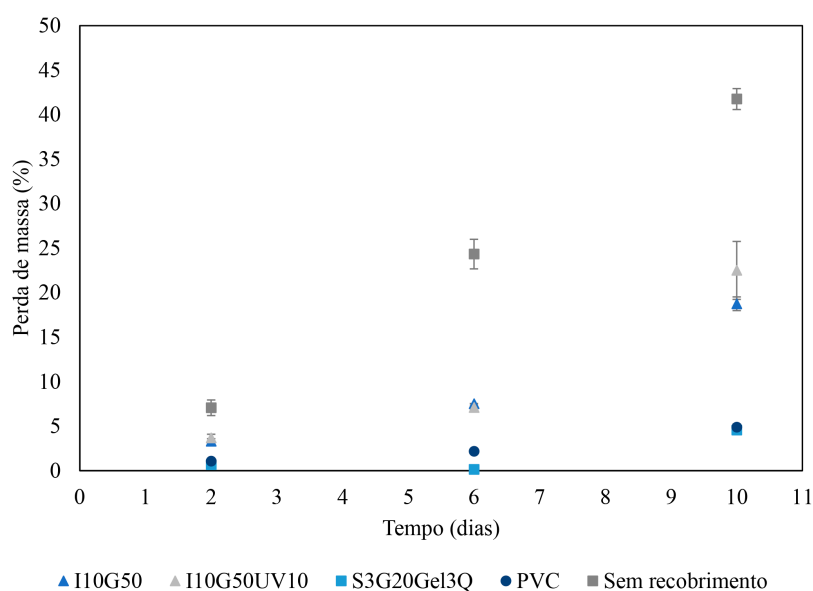


Figura 4.22 Perda de massa das amostras de queijo Minas frescal no teste de aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Assim como na análise direta, a perda de massa aumentou com o decorrer do tempo, em decorrência da perda de umidade para o meio. A utilização do recobrimento indireto minimizou consideravelmente a perda de massa e, conseqüentemente, a perda de umidade, em comparação com os resultados obtidos na análise direta, possivelmente devido à melhor vedação do material. Nesta análise, as amostras protegidas com os filmes de forma indireta apresentaram menor perda de massa em relação as amostras não protegidas. As menores porcentagens de variação de massa foram observadas para as amostras protegidas com o plástico filme e com o filme S3G20Gel3Q, estando ambos abaixo de 5 %.

4.8.2.3 Acidez total titulável

Os dados obtidos para a acidez total titulável (TA) são mostrados na Figura 4.23.

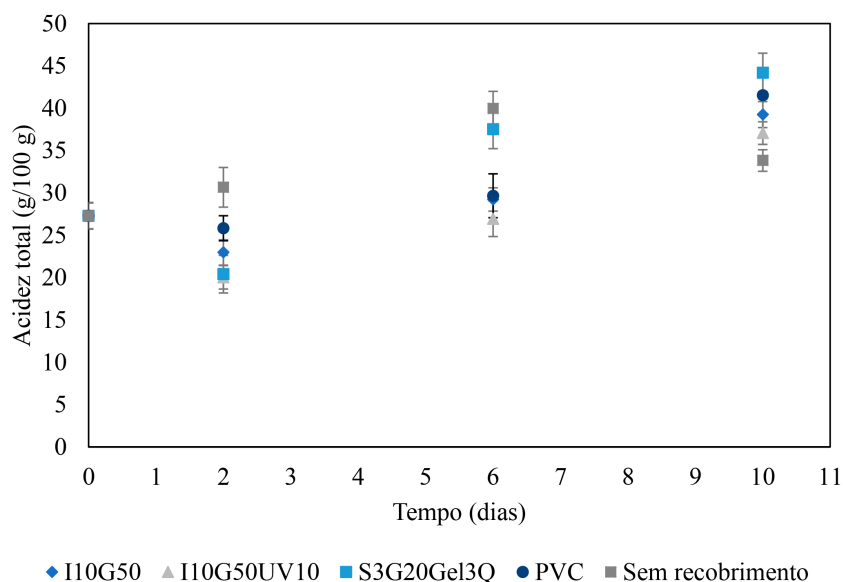


Figura 4.23 Acidez total titulável das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Assim como na análise direta, a TA aumentou linearmente durante os 10 dias de armazenamento para todas as amostras. O comportamento das amostras foi praticamente o mesmo que na análise direta.

4.8.2.4 pH

Em relação ao pH, a Figura 4.24 demonstra o comportamento das amostras de queijo minas frescal na aplicação indireta.

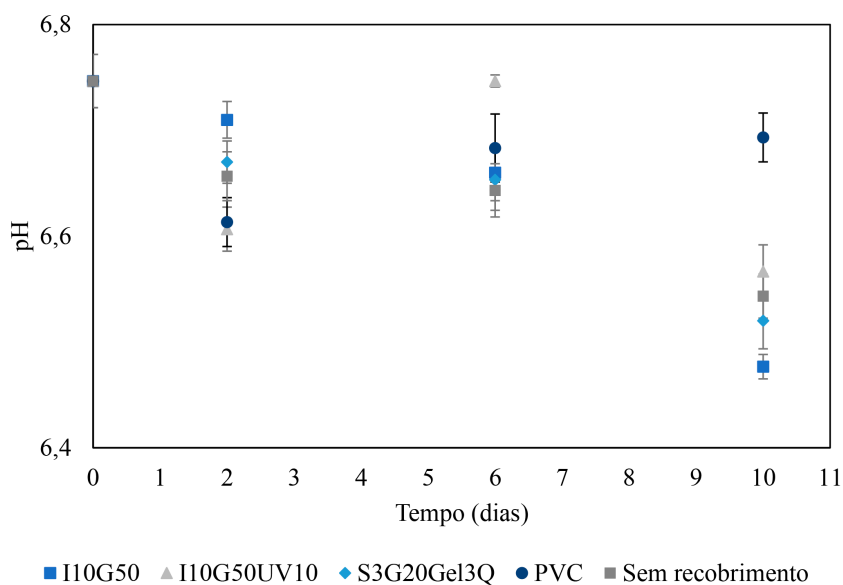





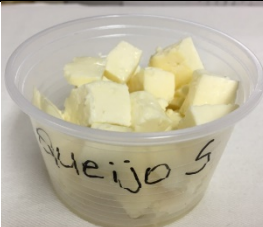
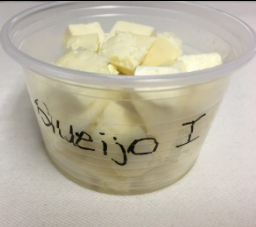







Figura 4.24 pH das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, filme de PVC e sem recobrimento, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

O pH apresentou comportamento semelhante ao obtido na aplicação direta. Pequenas variações nos primeiros 6 dias e queda no décimo dia, decorrente da presença de ácido láctico, conforme comentado anteriormente. Porém, a variação de pH foi inferior ao apresentado na aplicação direta.

4.8.2.5 Análise visual

A análise visual das amostras de queijo minas na aplicação indireta está apresentada na Tabela 4.34.

Tabela 4.36 Aspecto visual das amostras de queijo minas frescal no teste de aplicação indireta com os filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10, no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10
0			
2			
6			
10			

O comportamento da aparência das amostras teve semelhança ao ocorrido na análise direta, porém o amarelamento das amostras foi muito menos acentuado. Isso pode estar relacionado à menor perda de umidade, uma vez que as películas diminuíram a permeabilidade do sistema. Outro fator que pode ter contribuído para este resultado é a possibilidade de espaços sem recobrimento das películas na análise direta, que acarretou uma maior perda de umidade e

oxidação. A aparência das amostras condiz com a menor perda de massa da análise indireta em comparação com a análise direta.

4.8.2.6 Análises dos filmes

Análises de umidade e de opacidade foram realizadas nos filmes após serem utilizados na aplicação indireta no alimento. Na Tabela 4.37 estão exibidos os valores encontrados no dia zero e após o período de 10 dias.

Tabela 4.37 Análise dos filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 antes e após realização do teste de alimento indireto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR)

Filme	Umidade inicial (%)	Umidade final (%)	Opacidade inicial (A_{600}/mm)	Opacidade final (A_{600}/mm)
S3G20Gel3Q	$34,94 \pm 0,96$	$16,37 \pm 0,39$	$1,27 \pm 0,04$	$1,90 \pm 0,02$
I10G50	$41,77 \pm 5,15$	$30,22 \pm 1,56$	$0,21 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$
I10G50UV10	$27,19 \pm 3,02$	$30,60 \pm 0,99$	$0,22 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,01$

Como é possível observar, as amostras S3G20Gel3Q e I10G50 apresentaram diminuição em seus valores de umidade, devido à perda de água para o ambiente. A amostra de I10G50UV10 não sofreu alteração, podendo isso estar relacionada à sua característica filmogênica de menor hidroflicidade. Quanto à opacidade, sendo propriedade de grande importância na aplicação de filmes como embalagem alimentícia, todas as amostras de filmes apresentaram um aumento nesse aspecto, tornando-se mais opacos, sendo mais acentuado para o filme S3G20Gel3Q. O aumento da opacidade pode ser um fator negativo do ponto de vista do consumidor.

4.8.2.7 Considerações sobre aplicação dos filmes em alimentos

Os resultados obtidos no teste de aplicação em alimento mostraram que os filmes S3G20Gel3Q, I10G50 e I10G50UV10 reduziram o crescimento microbiano e prolongaram a vida útil do queijo minas frescal. Através da aplicação direta, o revestimento retardou o desenvolvimento da acidez indesejável, melhorou a textura e aparência, em comparação aos filmes embalados em filme de PVC. Na aplicação indireta, foi possível ainda verificar a diminuição da perda de massa e, conseqüentemente da umidade, porém o filme S3G20Gel3Q não foi eficaz no prolongamento da vida útil do queijo minas frescal, uma vez que as amostras recobertas com esse filme exibiram valores de bolores e leveduras superiores aos limites estabelecidos pela legislação após o sexto dia, um indicativo de deteriorização do alimento. De

forma geral, a aparência das amostras após os 10 dias de análise foi melhor na aplicação indireta que na direta.

Capítulo 5

5.1 Conclusões

Com base nos resultados experimentais obtidos na presente tese as seguintes conclusões podem ser estabelecidas.

- Soro de leite desmineralizado, gelatina e glicerol foram totalmente compatíveis para formar soluções filmogênicas e apresentaram resultados satisfatórios para aplicação em embalagens de alimentos. Todos os filmes resultantes foram homogêneos, independente da composição, e apresentaram boas propriedades mecânicas, transparência, baixa espessura e gramatura. A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier mostrou que os aditivos (quitosana e nano-quitosana) estão dispersos na matriz. As análises térmicas demonstraram que os filmes se encontram no estado amorfo, não houve separação de fases e há uma única temperatura inicial de decomposição, o que é uma indicação de boa compatibilidade entre o soro do leite, a gelatina e o glicerol. Os filmes com maior concentração de glicerol apresentaram maior estabilidade térmica e maior permeabilidade ao vapor de água. As fotomicrografias revelaram uma matriz lisa e com boa integridade. A formulação contendo 3 % m/V de soro de leite, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana foi selecionada com base nas propriedades analisadas na presente tese (apresentou uma menor espessura, maior transparência, menor solubilidade em água, com valores de solubilidade em etanol, umidade e permeabilidade ao vapor de água muito próximos às demais, exibindo uma boa estabilidade térmica). Além disso, através de testes preliminares, foi observado que as formulações com adição de quitosana indicaram um retardamento no crescimento microbiano.
- Os filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina apresentaram boas propriedades mecânicas, porém houve alterações nas análises térmicas com a incorporação da quitosana e da nano-quitosana, resultando em uma menor estabilidade térmica. A formulação que apresentou os resultados mais satisfatórios foi a de 3 % m/V de proteína concentrada de soro de leite, 30 % mss (massa/massa seca de proteína concentrada de soro de leite) de glicerol e 3 % m/V de gelatina, com propriedades promissoras para aplicação em embalagens de alimentos. Porém, através de testes

preliminares, foi observado que as formulações com adição de quitosana indicaram um retardamento no crescimento microbiano, desta forma foi adicionado 0,3 % mss de quitosana. Contudo, devido à dificuldade de formação de filme com a proteína concentrada de soro de leite, optou-se por não dar seguimento dos experimentos com os filmes obtidos com essa proteína.

- Filmes à base de proteína isolada do soro do leite incorporados com diferentes teores de óleo de semente de uva foram preparados e caracterizados. A incorporação de baixas concentrações de óleo (1 % e 10 %) revelou melhorias na permeabilidade ao vapor de água, solubilidade em água, umidade e hidrofobicidade do material. Também se obteve aumento da resistência à tração, porém com diminuição da flexibilidade. Em concentrações de óleo mais elevadas (20 % e 40 %), o resultado obtido foi o oposto, pois a presença de grandes aglomerados de gotículas lipídicas dentro da matriz da película enfraqueceu a resistência mecânica e a capacidade de barreira de água dos filmes, devido ao há um aumento das descontinuidades da matriz da película. A incorporação de óleo de semente de uva em baixas concentrações pode ser interessante para aplicação de embalagens, no entanto isso requer testes através de estudos em alimentos.
- Tendo como base a comparação realizada entre as formulações contendo 3 % m/V de soro de leite, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana; 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite e 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol; e 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite, 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol e 10 % mss de óleo de semente de uva, pode-se observar que os filmes à base de soro de leite apresentaram resultados satisfatórios e muitas vezes superiores aos filmes à base de proteína isolada do soro de leite. Esse resultado é promissor, uma vez que muitos estudos focam no uso de isolado e proteína concentrada do soro de leite em embalagens e há pouca literatura referente à aplicação do soro de leite desmineralizado. O uso do soro de leite é atrativo, uma vez que pode ser utilizado sem processamento.
- Pode-se sugerir que os filmes contendo 3 % m/V de soro de leite, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana; 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite e 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol; e 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite, 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol e 10 % mss de óleo de semente de uva,

podem ser armazenados sob refrigeração por período prolongado de estoque ou tempo de armazenamento. No entanto, a baixa temperatura ambiente de armazenamento pode induzir ao enfraquecimento das propriedades mecânicas dos filmes. Para o armazenamento no ambiente, sugere-se um tempo de armazenamento mais curto, de no máximo 4 meses.

- Pode-se sugerir que o filme contendo 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite, 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol e 10 % mss de óleo de semente de uva apresentou uma maior estabilidade no processo de envelhecimento acelerado, seguido do filme contendo 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite e 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol e do filme contendo 3 % m/V de soro de leite, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana. Também pode-se inferir que o filme contendo 3 % m/V de soro de leite, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana degradou após 360 h de exposição ao envelhecimento acelerado, o que corresponde a 9 meses.
- Os resultados de biodegradabilidade mostraram que as formulações contendo 3 % m/V de soro de leite, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana; 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite e 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol; e 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite, 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol e 10 % mss de óleo de semente de uva, são biodegradáveis, sendo que o filme à base de soro de leite exibiu a mais rápida degradação, de apenas uma semana.
- A aplicação dos filmes contendo 3 % m/V de soro de leite desmineralizado, 20 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol, 3 % m/V de gelatina e 0,3 % mss de quitosana; e dos filmes contendo 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite e 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol; e 10 % m/V de proteína isolada de soro de leite, 50 % mss (massa/massa seca de soro de leite) de glicerol e 10 % mss de óleo de semente de uva, em queijo minas frescal acarretou uma redução do crescimento microbiano e prolongamento da vida útil do alimento. Através da aplicação direta, o revestimento retardou o desenvolvimento da acidez indesejável, melhorou a textura e aparência, em comparação aos filmes embalados em poli(cloreto de vinila). Na aplicação indireta, foi possível ainda a diminuição da perda de massa e, conseqüentemente umidade, porém o filme à base de soro de leite desmineralizado não

foi eficaz no prolongamento da vida útil do queijo minas frescal. De forma geral, a aparência das amostras após os 10 dias de análise foi melhor na aplicação indireta que na direta.

Referências

- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. São Paulo. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em 27/06/2017.
- ABRE. Associação Brasileira de Embalagem. São Paulo. Disponível em: <<http://www.abre.org.br>>. Acesso em 22/04/2020.
- ABRELPE. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. São Paulo. Disponível em: <<http://www.abrelpe.org.br>>. Acesso em 22/04/2020.
- ABEDINIA, A. et al. Preparation and characterization of a novel biocomposite based on duck feet gelatin as alternative to bovine gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 855–862, 2018.
- ABUGOCH, L. E. et al. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 879–886, 2011.
- ACHET, D.; HE, X. W. Determination of the renaturation level in gelatin films. **Polymer**, v. 36, n. 4, p. 787–791, 1995.
- AGUDELO-CUARTAS, C. et al. Characterization of whey protein-based films incorporated with natamycin and nanoemulsion of α -tocopherol. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03809, 2020.
- AHMAD, A. L. et al. Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 3, p. 879–882, 2011.
- AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 189–199, 2012.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 837–842, 2010.
- AKCAN, T.; ESTÉVEZ, M.; SERDAROGLU, M. Antioxidant protection of cooked meatballs during frozen storage by whey protein edible films with phytochemicals from *Laurus nobilis* L. and *Salvia officinalis*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 323–331, 2017.
- ANDRADE, M. A. et al. Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, n. February, p. 497–508, 2018.

- ANDREUCCETTI, C. et al. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 129–136, 2011.
- ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A.-M. Relationship between the Microstructure and the Mechanical and Barrier Properties of Whey Protein Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 3806–3816, 2000.
- ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A.-M. Aging of Whey Protein Films and the Effect on Mechanical and Barrier Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 989–995, 2001.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113–126, 2002.
- ARFAT, Y. A. et al. Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 191–202, 2017.
- ARVANITTOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 4, p. 371–382, 1998.
- ASHTER, S. A. **Introduction to Bioplastics Engineering**. Oxford: Elsevier, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC - Official methods of Analysis**. 19. ed. Washington, DC: [s.n.].
- ASTM. G154 Standard Practice for Operating Fluorescent Ultraviolet (UV) Lamp Apparatus for Exposure of Nonmetallic Materials 1. **Astm**, p. 1–12, 2014.
- ATRA, R. et al. Investigation of ultra- And nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 325–332, 2005.
- AZEVEDO, V. M. et al. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 179–188, 2015.
- AZEVEDO, V. M. et al. Effect of replacement of corn starch by whey protein isolate in biodegradable film blends obtained by extrusion. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 971–980, 2017.
- AZEVEDO, V. M. et al. Effect of whey protein isolate films incorporated with montmorillonite and citric acid on the preservation of fresh-cut apples. **Food Research International**, v. 107, n. February, p. 306–313, 2018.
- BAHRAM, S. et al. Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential

- oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1251–1258, 2014.
- BAHRAM, S. et al. Effect of Whey Protein Concentrate Coating Cinamon Oil on Quality and Shelf Life of Refrigerated Beluga Sturgeon (*Huso Huso*). v. 00, p. 1–7, 2016.
- BAIL, S. et al. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1122–1132, 2008.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 381–386, 2011.
- BALZER, P. S. et al. Estudo das Propriedades Mecânicas de um Composto de PVC Modificado com Fibras de Bananeira. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 1–4, 2007.
- BANDEIRA, S. F. et al. Modified Gelatin Films from Croaker Skins: Effects of pH, and Addition of Glycerol and Chitosan. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 6, p. 613–620, 2015.
- BANERJEE, R.; CHEN, H. Functional Properties of Edible Films Using Whey Protein Concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 8, p. 1673–1683, 1995.
- BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan-TPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, n. 2, p. 270–277, 2008.
- BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, n. 1, p. 147–152, 2003.
- BASIAK, E.; LENART, A.; DEBEAUFORT, F. Effects of carbohydrate/protein ratio on the microstructure and the barrier and sorption properties of wheat starch-whey protein blend edible films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. June, 2016.
- BERISTAIN-BAUZA, S. DEL C. et al. Antimicrobial activity of whey protein films supplemented with *Lactobacillus sakei* cell-free supernatant on fresh beef. **Food Microbiology**, v. 62, p. 207–211, 2017.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Processing of Soft Hispanic Cheese (“Queso Fresco”) Using Thermo-Sonicated Milk: A Study of Physicochemical Characteristics and Storage Life. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, 2010.
- BIGI, A. et al. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v. 23, n. 24, p. 4827–4832, 2002.
- BIGUCCI, F. et al. Development and characterization of chitosan/hyaluronan film for

- transdermal delivery of thiocolchicoside. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 32–40, 2015.
- BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1633–1641, 2008.
- BRANDALISE, R. N. Avaliação da degradação biótica e abiótica da mistura polimérica de polietileno de alta densidade com o poli(álcool vinílico). p. 161, 2008.
- BRYANT, C. M.; JULIAN MCCLEMENTS, D. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 143–151, 1998.
- BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 1995. v. G3
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied ...**, p. 125–132, 1997.
- CAMPO, C. DE et al. Gelatin capsule waste : new source of protein to develop a biodegradable film. v. 27, n. 2, p. 100–107, 2017.
- CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 4, p. 575–584, 2007.
- CAO, N.; YANG, X.; FU, Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 729–735, 2009.
- CECCHINI, J. P. et al. Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. **Food Science and Technology International**, n. 3000, p. 371–381, 2017.
- CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 11, p. 2563–2583, 1995.
- CHEN, H. et al. Application of protein-based films and coatings for food packaging: A review. **Polymers**, v. 11, n. 12, p. 1–32, 2019.
- CHENG, S. Y.; WANG, B. J.; WENG, Y. M. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 115–121, 2015.
- CHIOU, B. SEN et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 11, p. 3748–3753, 2008.
- CHRONAKIS, I. S.; KASAPIS, S. Structural properties of single and mixed milk/soya protein systems. **Food Hydrocolloids**, v. 7, n. 6, p. 459–478, 1993.

- CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Storage-induced changes in functional properties of glycerol plasticized - Soybean protein concentrate films produced by casting. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 247–255, 2015.
- COMFORT, S.; HOWELL, N. K. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 6, p. 661–672, 2002.
- CUQ, B. et al. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. **Polymer Gels and Networks**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 1997.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. Fourth ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- DANGARAN, K. L.; KROCHTA, J. M. Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallisation in whey protein films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1094–1100, 2007.
- DE ANDRADE, C. S. et al. Development and characterization of multilayer films based on polyhydroxyalkanoates and hydrocolloids. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 6, p. 1–8, 2017.
- DE ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P.; ANDRADE, R. L. P. DE. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 249–253, 2002.
- DE OLIVEIRA, A. C. S. et al. Development of whey protein isolate/polyaniline smart packaging: Morphological, structural, thermal, and electrical properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 14, p. 1–6, 2019.
- DI PIERRO, P. et al. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2324–2327, 2011.
- DICK, M. et al. Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. **Carbohydrate polymers**, v. 130, p. 198–205, 2015.
- DING, J. et al. Impact of nano / micron vegetable carbon black on mechanical , barrier and anti-photooxidation properties of fish gelatin film. n. May, 2017.
- ESCÁRCEGA-GALAZ, A. A. et al. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 472–481, 2018.
- FABRA, M. J.; LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Use of the electrohydrodynamic

- process to develop active/bioactive bilayer films for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 11–18, 2016.
- FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 3, p. 393–400, 2008.
- FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 676–683, 2009.
- FAKHOURI, F. M. et al. 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**, v. 109, p. 57–64, 2015.
- FALC, I.; RANDAZZO, W.; GLORIA, S. Food Hydrocolloids Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts María Jose. v. 81, p. 96–103, 2018.
- FARRELL, H. M. et al. Secondary structural studies of bovine caseins: Structure and temperature dependence of β -casein phosphopeptide (1-25) as analyzed by circular dichroism, FTIR spectroscopy, and analytical ultracentrifugation. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 307–321, 2002.
- FARRIS, S. et al. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 61–70, 2011.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- FENG, Z. et al. Food Hydrocolloids Edible coating based on whey protein isolate nano fibers for antioxidation and inhibition of product browning. **Food hydrocolloids**, v. 79, p. 179–188, 2018.
- FERNANDES, L. et al. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 161–166, 2013.
- FERNANDES, L. M. et al. Whey protein films added with galactooligosaccharide and xylooligosaccharide. **Food Hydrocolloids**, v. 104, n. September 2019, 2020.
- FIORI, L. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 71–80, 2014.

- FLAKER, C. H. C. et al. Gelatin-based nanocomposite films: A study on montmorillonite dispersion methods and concentration. **Journal of Food Engineering**, v. In press, p. 65–70, 2014.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Milk proteins**. First ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. v. 1
- GALUS, S. et al. Effect of oxidized potato starch on the physicochemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 403–409, 2013.
- GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Moisture Sensitivity, Optical, Mechanical and Structural Properties of Whey Protein-Based Edible Films Incorporated with Rapeseed Oil. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 78–89, 2016a.
- GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 78–86, 2016b.
- GHADETAJ, A.; ALMASI, H.; MEHRYAR, L. Development and characterization of whey protein isolate active films containing nanoemulsions of Grammosciadium ptrocarpum Bioss . essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, n. September 2017, p. 31–40, 2018.
- GHANBARZADEH, B.; OROMIEHI, A. R. Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 517–524, 2009.
- GILBERT, V. et al. Characterization and evaluation of whey protein-based biofilms as substrates for in vitro cell cultures. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7471–7480, 2005.
- GIROUX, H. J.; LANOUILLE, G.; BRITTEN, M. Effect of whey protein aggregates of various sizes on the formation and properties of rennet-induced milk gels. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 272–278, 2015.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 511–520, 2007.
- GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1461–1469, 2011.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 1, p. 25–34, 2002.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin

- from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.
- GOUNGA, M. E.; XU, S. Y.; WANG, Z. Film forming mechanism and mechanical and thermal properties of whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan content. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 501–519, 2010.
- GUERRERO, P. et al. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 65–72, 2011.
- HARUN-OR-RASHID, M. D. et al. Effect of hydrochloric acid on the properties of biodegradable packaging materials of carboxymethylcellulose/poly(vinyl alcohol) blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 2, p. 42870, 2016.
- HASSAN, B. et al. Recent advances on polysaccharides , lipids and protein based edible films and coatings : A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1095–1107, 2018.
- HELANDER, I. M. et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2–3, p. 235–244, 2001.
- HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 231–240, 2008.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. et al. Mechanical and Water Barrier Properties of Glutenin Films Influenced by Storage Time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 79–83, 2004.
- HONG, S. I.; KROCHTA, J. M. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 739–745, 2006.
- HOQUE, M. S. et al. Properties of blend film based on cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin and mungbean protein isolate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 663–673, 2011.
- INTERNATIONAL, A. Standard Practice for Evaluating Microbial Susceptibility of Nonmetallic Materials By Laboratory Soil Burial Test. **ASTM International**, v. i, n. January, p. 3–5, 2004.
- INTERNATIONAL, A. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials,

method E96/E96M. In: West Conshohocken, PA: [s.n.]. p. 1–10.

JAFARI, S. M. et al. Hydrophobicity, thermal and micro-structural properties of whey protein concentrate-pullulan-beeswax films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 506–511, 2015.

JAMBRAK, A. R. et al. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. **Journal of Food Engineering**, v. 121, n. 1, p. 15–23, 2014.

JANJARASSKUL, T. et al. Barrier and tensile properties of whey protein-candelilla wax film/sheet. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 377–382, 2014.

JANJARASSKUL, T.; TANANUWONG, K. **Role of Whey Proteins in Food Packaging**. [s.l.] Elsevier, 2019.

JAVANMARD, M.; GOLESTAN, L. Effect of olive oil and glycerol on physical properties of whey protein concentrate films. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, n. 5, p. 628–639, 2008.

JIA, Z. et al. Effect of covalent modification by (À) -epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 305–310, 2016.

JIANG, Y. et al. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 5100–5108, 2010.

JIMÉNEZ, A. et al. Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 302–310, 2012.

JONES, A.; MANDAL, A.; SHARMA, S. Protein-based bioplastics and their antibacterial potential. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 18, p. 1–11, 2015.

JONGJAREONRAK, A. et al. Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 4, p. 492–501, 2006.

JOO, E. et al. Food Hydrocolloids Whey protein-coated high oxygen barrier multilayer films using surface pretreated PET substrate. **Food hydrocolloids**, v. 80, p. 1–7, 2018.

JUNG, E. J. et al. Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 4, p. 676–682, 2010.

KADAM, D. M. et al. Preparation and characterization of whey protein isolate films

- reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 1, p. 133–140, 2013.
- KAEWPRACHU, P. et al. Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study. **Packaging Technology and Science**, v. 29, p. 77–90, 2016.
- KANMANI, P.; RHIM, J. W. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 644–652, 2014.
- KET-ON, A. et al. Properties and storage stability of whey protein edible film with spice powders. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 2933–2942, 2016.
- KHANZADI, M. et al. Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate-pullulan by application of beeswax. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 24–29, 2015.
- KHODAEI, D.; OLTROGGE, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Preparation and characterization of blended edible films manufactured using gelatin, tragacanth gum and, Persian gum. **Lwt**, v. 117, n. February 2019, p. 108617, 2020.
- KHWALDIA, K. et al. Milk proteins for edible films and coatings. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 239–251, 2004.
- KOCAK, N. et al. International Journal of Biological Macromolecules Synthesis and characterization of novel nano-chitosan Schiff base and use of lead (II) sensor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1159–1166, 2012.
- KOKOSZKA, S. et al. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 503–510, 2010a.
- KOKOSZKA, S. et al. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 1, p. 53–60, 2010b.
- KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.
- KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and Fermented Milk Foods. Volume I: Origins and Principles**. Westport: F. V. Kosikowski, 1997.
- KUREK, M.; GALUS, S.; DEBEAUFORT, F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 1, n. 1, p. 56–67, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

- Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LE TIEN, C. et al. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5566–5575, 2000.
- LEE, K. Y.; YANG, H. J.; SONG, K. BIN. Application of a puffer fish skin gelatin film containing *Moringa oleifera* Lam. leaf extract to the packaging of Gouda cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 11, p. 3876–3883, 2016.
- LI, J.; CHEN, H. Biodegradation of whey protein-based edible films. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 8, n. 3, p. 135–144, 2000.
- LI, X. et al. Fabrication of gelatin-laponite composite films: Effect of the concentration of laponite on physical properties and the freshness of meat during storage. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 390–398, 2015.
- LIU, F. et al. Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 1–9, 2017a.
- LIU, G.; ZHONG, Q. Thermal aggregation properties of whey protein glycosylated with various saccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 87–96, 2013.
- LIU, J. et al. Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 457–466, 2017b.
- LÓPEZ-CABALLERO, M. E. et al. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 2, p. 303–311, 2005.
- LÓPEZ, O. V.; GARCÍA, M. A. Starch films from a novel (*Pachyrhizus ahipa*) and conventional sources: Development and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 7, p. 1931–1940, 2012.
- LUKASIK, K. V.; LUDESCHER, R. D. Molecular mobility in water and glycerol plasticized cold- and hot-cast gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 96–105, 2006.
- LV, S. et al. Soil burial-induced chemical and thermal changes in starch/poly (lactic acid) composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 338–344, 2018.
- MA, W. et al. Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 572–579, 2012.
- MAIER, T. et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 551–559, 2009.
- MALI, S. et al. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films.

- Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 129–135, 2004.
- MARQUEZ, G. R. et al. Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 124–130, 2017.
- MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305–315, 2010.
- MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 3, p. 377–383, 2010.
- MASTROMATTEO, M. et al. Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 591–598, 2010.
- MATERIALS, A. S. FOR T. AND. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (ASTM D882-10 2010). In: **Annual book of ASTM standards**. Philadelphia, PA: [s.n.].
- MCHUGH, T. H.; AUJARD, J. F.; KROCHTA, J. M. Plasticized Whey Protein Edible Films: Water Vapor Permeability Properties. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 2, p. 416–419, 1994.
- MCHUGH, T. H.; AVENABUSTILLOS, R.; KROCHTA, J. M. Hydrophilic Edible Films - Modified Procedure for Water-Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 899–903, 1993.
- MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 3, p. 307–312, 1994a.
- MCHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol-plasticized vs glycerol-plasticized whey-protein edible films - integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841–845, 1994b.
- MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. **Edible Films and Coatings for Food Applications**. New York: Springer Dordrecht Heidelberg London, 2015. v. 1
- MILLER, K. S.; CHIANG, M. T.; KROCHTA, J. M. Heat Curing of Whey Protein Films. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 6, p. 1189–1193, 1997.
- MIN, S.; KROCHTA, J. M. Inhibition of *Penicillium commune* by Edible Whey Protein Films Incorporating Lactoferrin, Lactoferrin Hydrolysate, and Lactoperoxidase Systems. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 87–94, 2005.

- MITRAKAS, G. E.; KOUTSOUMANIS, K. P.; LAZARIDES, H. N. Impact of edible coating with or without anti-microbial agent on microbial growth during osmotic dehydration and refrigerated storage of a model plant material. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 550–555, 2008.
- MODITSI, M. et al. Modifying the physical properties of dairy protein films for controlled release of antifungal agents. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 195–203, 2014.
- MOHAJER, S.; REZAEI, M.; HOSSEINI, S. F. Physico-chemical and microstructural properties of fish gelatin/agar bio-based blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 784–793, 2017.
- MOHEBI, E.; SHAHBAZI, Y. Application of chitosan and gelatin based active packaging films for peeled shrimp preservation: A novel functional wrapping design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 108–116, 2017.
- MONEDERO, F. M. et al. Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 4, p. 509–515, 2009.
- MOORE, G. . F.; SAUNDERS, S. M. **Advances in Biodegradable Polymers**. [s.l.] Rapra Technology Limited, 1997.
- MORENO, O. et al. Physical and bioactive properties of corn starch - Buttermilk edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 141, p. 27–36, 2014.
- MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.
- MUÑOZ, L. A. et al. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 3, p. 511–518, 2012.
- MURILLO-MARTÍNEZ, M. M. et al. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 577–585, 2011.
- NAWAB, A. et al. International Journal of Biological Macromolecules Innovative edible packaging from mango kernel starch for the shelf life extension of red chili powder. v. 114, p. 626–631, 2018.
- NOWZARI, F.; SHÁBANPOUR, B.; OJAGH, S. M. Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1667–1672, 2013.

- NUTHONG, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 2, p. 143–148, 2009.
- OLABARRIETA, I. et al. Aging properties of films of plasticized vital wheat gluten cast from acidic and basic solutions. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1657–1664, 2006a.
- OLABARRIETA, I. et al. Properties of aged montmorillonite-wheat gluten composite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1283–1288, 2006b.
- ORLIAC, O. et al. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 2, p. 91–100, 2003.
- OSÉS, J. et al. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 125–131, 2009.
- OYMACI, P.; ALTINKAYA, S. A. Improvement of barrier and mechanical properties of whey protein isolate based food packaging films by incorporation of zein nanoparticles as a novel bionanocomposite. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 1–9, 2016.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 116–123, 2008a.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 2, p. 215–224, 2008b.
- OZER, B. B. P. et al. Development of a novel strategy for controlled release of lysozyme from whey protein isolate based active food packaging films. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 877–886, 2016.
- PAN, H. et al. Impact of phase separation of soy protein isolate/sodium alginate co-blending mixtures on gelation dynamics and gels properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 169–179, 2015.
- PANG, Z. et al. Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 340–351, 2015.
- PAOLI, M. DE. **Degradação e Estabilização de Polímeros**. 2ª ed. [s.l.] chemkeys, 2008.
- PARRY, J. et al. Characterization of cold-pressed onion, parsley, cardamom, mullein, roasted pumpkin, and milk thistle seed oils. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists'**

Society, v. 83, n. 10, p. 847–854, 2006.

PEREDA, M. et al. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, 2011.

PEREDA, M.; AMICA, G.; MARCOVICH, N. E. Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1318–1325, 2012.

PEREDA, M.; ARANGUREN, M. I.; MARCOVICH S, N. E. Caseinate films modified with tung oil. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 800–808, 2010.

PEREIRA, J. O. et al. Impact of whey protein coating incorporated with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* on sliced ham properties. **Meat Science**, v. 139, n. May 2017, p. 125–133, 2018.

PÉREZ, L. M. et al. Effect of different combinations of glycerol and/or trehalose on physical and structural properties of whey protein concentrate-based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 352–359, 2016.

PEZRON, I.; DJABOUROV, M.; LELBOND, J. Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A light and small-angle neutron scattering study. **Polymer**, v. 32, n. 17, p. 3201–3210, 1991.

PHAN, T. D. et al. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 973–981, 2005.

PHAN THE, D. et al. Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 691–699, 2009.

PHUPOKSAKUL, T. et al. Effect of storage temperature and time on stability of poly(lactide)-whey protein isolate laminated films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 25, p. 1–9, 2016.

RAMOS, Ó. L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 110–122, 2013.

RENAULT, F. et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes - An eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 5, p. 1337–1348, 2009.

RHIM, J.-W. W.; PARK, H.-M. M.; HA, C.-S. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1629–1652, 2013.

RHIM, J. W.; WANG, L. F.; HONG, S. I. Preparation and characterization of agar/silver

- nanoparticles composite films with antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 327–335, 2013.
- RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 4, p. 531–539, 2009.
- ROBERTSON, G. L. **Food packaging: Principles and Practice**. Third edit ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.
- ROCHA, C. et al. Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1734–1745, 2009.
- ROSS-MURPHY, S. B. Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. **Polymer**, v. 33, n. 12, p. 2622–2627, 1992.
- RYAN, K. N. et al. Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 411–420, 2012.
- RYAN, K. N.; ZHONG, Q.; FOEGEDING, E. A. Use of whey protein soluble aggregates for thermal stability—a hypothesis paper. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, 2013.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2102–2109, 2009.
- SARBON, N. M.; BADI, F.; HOWELL, N. K. The effect of chicken skin gelatin and whey protein interactions on rheological and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 83–92, 2015.
- SCHMID, M. **Whey protein-based coatings as sustainable barrier material in food packaging applications**. IAPRI World Packaging Conference. **Anais...**2012
- SCHMID, M. Properties of cast films made from different ratios of whey protein isolate, hydrolysed whey protein Isolate and Glycerol. **Materials**, v. 6, n. 8, p. 3254–3269, 2013.
- SCHMID, M. et al. Storage time-dependent alteration of molecular interaction–property relationships of whey protein isolate-based films and coatings. **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 12, p. 4396–4404, 2015.
- SEGAT, A. et al. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. **Food Research International**, v. 66, p. 365–372, 2014.
- SELKE, S. E. M. **Plastics Packaging Technology**. Munich: Hanser Publishers, 1997.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**,

v. 39, n. 5, p. 639–644, 2006.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics : A comprehensive review. v. 26, p. 246–265, 2008.

SHAHBAZI, M. et al. The physico-mechanical and structural characteristics of blend film of poly (vinyl alcohol) with biodegradable polymers as affected by disorder-to-order conformational transition. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 393–404, 2016.

SHAMS, B.; EBRAHIMI, N. G.; KHODAIYAN, F. Development of antibacterial nanocomposite: Whey protein-gelatin-nanoclay films with orange peel extract and tripolyphosphate as potential food packaging. **Advances in Polymer Technology**, v. 2019, 2019.

SHANKAR, S. et al. Food Hydrocolloids Preparation , characterization , and antimicrobial activity of gelatin / ZnO nanocomposite films. **Food hydrocolloids**, v. 45, p. 264–271, 2015.

SHAW, N. B. et al. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. **Journal of Food Engineering**, v. 51, n. 4, p. 299–304, 2002.

SHINAGAWA, F. B. et al. Grape seed oil : a potential functional food ? v. 35, n. 3, p. 399–406, 2015.

SILVA, K. S. et al. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 179–188, 2016.

SILVA, K. S. et al. Physicochemical and microstructural properties of whey protein isolate-based films with addition of pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, n. June 2017, p. 122–128, 2018.

SILVERSTEIN, M. R.; WEBSTER, X. F.; KIEMLE, J. D. **Spectrometric identification of organic compounds**. Seventh ed. New York: Wiley, 2005.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. v. 25, p. 795–801, 2004.

SOAZO, M.; RUBIOLO, A. C.; VERDINI, R. A. Effect of drying temperature and beeswax content on physical properties of whey protein emulsion films. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1251–1255, 2011.

SOLÍS-OBA, M. et al. Application of Infrared Spectroscopy to the Monitoring of Lactose and Protein From Whey After Ultra and Nano Filtration Process. v. 55, n. 3, p. 190–193, 2011.

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

- SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Water Vapor Permeability and Solubility of Films from Hydrolyzed Whey Protein. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 700–703, 2000.
- SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer effect on mechanical properties of B-lactoglobulin films. **Journal of Food Engineering**, v. 50, n. 3, p. 149–155, 2001.
- SU, J. F. et al. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 145–153, 2010.
- SUBIRADE, M. et al. Molecular basis of film formation from a soybean protein: Comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 4, p. 241–249, 1998.
- SUKHIJA, S.; SINGH, S.; RIAR, C. S. Analyzing the effect of whey protein concentrate and psyllium husk on various characteristics of biodegradable film from lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome starch. **Food hydrocolloids**, v. 60, p. 128–137, 2016.
- THAKUR, R. et al. Scientia Horticulturae Development and application of rice starch based edible coating to improve the postharvest storage potential and quality of plum fruit (*Prunus salicina*). **Scientia Horticulturae**, v. 237, n. April, p. 59–66, 2018.
- THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 71–78, 2003.
- TREZZA, T. A.; KROCHTA, J. M. Color Stability of Edible Coatings During Prolonged Storage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1166–1169, 2000.
- TYUFTIN, A. A. et al. Development and assessment of duplex and triplex laminated edible films using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, 2020.
- VANIN, F. M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 5, p. 899–907, 2005.
- VARGAS, M. et al. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 536–547, 2009.
- VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 762–769, 2009.
- VERMEIREN, L. et al. Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 3, p. 77–86, 1999.
- VILLALOBOS, R. et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films

containing surfactants as affected by their microstructure. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 53–61, 2005.

WAGH, Y. R. et al. Preparation and characterization of milk protein films and their application for packaging of Cheddar cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 3767–3775, 2014.

WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A.-M. Mixed gels of fine-stranded and particulate networks of gelatin and whey proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 8, n. 6, p. 589–607, 1994.

WANG, L.; AUTY, M. A. E.; KERRY, J. P. Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 199–207, 2010.

WANG, L. Z. et al. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1128–1138, 2007.

WANG, W. et al. Using Liquid Smoke to Improve Mechanical and Water Resistance Properties of Gelatin Films. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 5, p. 1151–1157, 2016.

WANG, Y. et al. Physicochemical properties of gelatin films containing tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles generated by electrospray. **Materials and Design**, v. 185, p. 108277, 2020.

WEIZMAN, O. et al. Modified whey protein coatings for improved gas barrier properties of biodegradable films. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 2016, n. June 2016, 2016.

WEN-QIONG, W.; YI-HONG, B.; YING, C. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 355–361, 2013.

WIHODO, M.; MORARU, C. I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 292–302, 2013.

XIAO, J. et al. Impact of melting point of palm oil on mechanical and water barrier properties of gelatin-palm oil emulsion film. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 243–251, 2016.

YADA, R. Y. **Protein in Food Processing**. England: Woodhead Publishing, 2004.

YANG, H.-J. et al. Application of gelatin film and coating prepared from dried alaska pollock by-product in quality maintenance of grape berries. **Journal of Food Processing and Preservation**, n. September 2016, p. e13228, 2017.

YANG, L.; PAULSON, A. T. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan

- films. **Food Research International**, v. 33, n. 7, p. 563–570, 2000.
- YANG, L.; PAULSON, A. T.; NICKERSON, M. T. Mechanical and physical properties of calcium-treated gellan films. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1439–1443, 2010.
- YANG, Y. et al. Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 555–561, 2012.
- ZHANG, W. et al. Enhanced physicochemical properties of chitosan/whey protein isolate composite film by sodium laurate-modified TiO₂ nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 59–65, 2016.
- ZHANG, X. et al. Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 1125–1132, 2010.
- ZHONG, Y.; CAVENDER, G.; ZHAO, Y. Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 1–8, 2014.
- ZINOVIADOU, K. G.; KOUTSOUMANIS, K. P.; BILIADERIS, C. G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 1, p. 49–59, 2010.
- ZÚÑIGA, R. N. et al. Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: Effect of their microstructure. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 1147–1158, 2012.

Apêndice A

Filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina

A seguir serão apresentadas as propriedades mecânicas, físicas, morfológicas, químicas, de barreira e térmicas dos filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina. Ao final, será selecionada a melhor formulação, com base em suas propriedades para aplicação como embalagem de alimentos.

A.1 Caracterização dos filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina

Durante o processo de desnaturação do WPC houve a formação de coalho, o que sugere que há presença de caseína em sua composição, esse fato impossibilitou a utilização de um maior teor de WPC em relação ao teor de gelatina para as soluções filmogênicas. No processo tradicional de fabricação de queijos, a matriz do coalho é formada por caseínas, que constituem cerca de 80 % das proteínas do leite, ao passo que os 20 % restantes constituem as proteínas do soro do leite (GIROUX; LANOUILLE; BRITTEN, 2015). A seguir serão apresentadas as propriedades mecânicas, físicas, morfológicas, químicas, de barreira e térmicas das formulações apresentadas na Tabela 3.3 (C3G30Gel3, C3G30Gel3Q e C3G30Gel3N).

A.2 Propriedades mecânicas

Na Tabela A.1 estão apresentados os valores do módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ϵ_b) e tensão de ruptura (σ_b). O filme C3G30Gel3 apresentou E de $23,66 \pm 0,32$ MPa, ϵ_b de $2,94 \pm 0,24$ % e σ_b de $23,87 \pm 0,88$ MPa. Apesar de um baixo alongamento na ruptura, a tensão de ruptura encontrada foi superior a dados encontrados na literatura. Alguns exemplos podem ser citados: Azevedo et al. (2015) encontraram valores de ϵ_b de $60,46 \pm 8,37$ % e σ_b de $3,63 \pm 0,40$ MPa para filmes à base de WPI (6 g m/v) e glicerol (2,4 g g/100 g de WPI); Kaewprachu et al. (2016) para filmes à base de gelatina bovina comercial (7 % m/v) e glicerol (50 %, baseado no teor de proteína), encontraram valores de ϵ_b de $220 \pm 17,6$ % e σ_b de $4,50 \pm 0,58$ MPa e para filmes à base de WPC (7 % m/v) e glicerol (50 %, baseado no teor de proteína), obtiveram valores de ϵ_b de $84 \pm 15,9$ % e σ_b de $6,14 \pm 0,15$ MPa; Pérez et al. (2016) fabricaram filmes de WPC (8 % m/m) e glicerol (4 % m/m) e obtiveram valores aproximados de ϵ_b de 5,5 % e 1,5 MPa para ϵ_b e σ_b , respectivamente; Wang, Li, Zhang, & Ni (2016) para filmes à base de gelatina bovina (6% massa total) e glicerol (30 % massa total) obtiveram ϵ_b de 14 %

e σ_b de aproximadamente 10 MPa. Constata-se que as diferenças nos valores apresentados são decorrentes, principalmente, de diferentes formulações.

Tabela A.1 Módulo de Young (E), alongamento na ruptura (ε_b) e tensão de ruptura (σ_b) de diferentes formulações de filmes à base de proteína concentrada do soro de leite e gelatina com e sem adição de quitosana e nano-quitosana.

Filme	Módulo de Young (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Tensão de ruptura (MPa)
C3G30Gel3	23,66 ± 0,32 ^a	2,94 ± 0,24 ^a	23,87 ± 0,88 ^a
C3G30Gel3Q	16,78 ± 2,73 ^b	3,10 ± 1,39 ^a	16,80 ± 2,07 ^b
C3G30Gel3N	17,63 ± 0,64 ^b	6,07 ± 1,84 ^a	23,88 ± 1,34 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Pela análise da tabela, é possível verificar que a incorporação dos aditivos quitosana e nano-quitosana alterou as propriedades mecânicas dos filmes. Houve uma redução do E e σ_b (apenas para a nano-quitosana), porém ε_b se manteve constante, o que indica que os filmes se tornaram mais fracos e mais flexíveis. Uma tendência semelhante foi observada por Andreuccetti, Carvalho, Galicia-García, Martínez-Bustos, & Grosso (2011), onde a incorporação de surfactante em filmes à base de gelatina de porco (4 % m/m) e lecitina de soja (10 % m/m) acarretaram redução do σ_b e aumento no ε_b . Javanmard & Golestan (2008) também obtiveram resultados semelhantes, onde filmes à base de WPC (10 % m/m) e glicerol (razão proteína:glicerol de 0,5, 0,6 e 0,7 m/m) resultaram em uma redução do E e σ_b e no aumento de ε_b com a adição de óleo de oliva. A justificativa fornecida pelos autores para este resultado foi que a fase de proteína tem σ_b mais elevado que a fase lipídica. Em outra pesquisa, Bahram et al. (2014) também constataram que a incorporação de óleo essencial de cinamomo acarretou redução do σ_b de filmes à base de WPC (8 % m/v) e glicerol (8 % m/v). Comportamento contrário foi encontrado por Khanzadi et al. (2015) onde a incorporação de cera de abelha em filmes à base de WPC (30, 50 e 70 % m/m) e glicerol (20 % m/m_{seca}) acarretou redução do ε_b e aumento da σ_b .

A.3 Propriedades físicas

A espessura de diferentes filmes à base de WPC e gelatina estão apresentadas na Tabela A.2. As espessuras dos filmes à base de WPC e gelatina foram de aproximadamente 88 μm , e sofrem um aumento para próximo de 108 μm após a incorporação de quitosana e nano-quitosana. Na verdade, a mesma massa de solução filmogênica foi utilizada, porém a matéria seca das soluções aumenta com a incorporação de aditivos. Alguns autores também relataram aumento da espessura com a incorporação de aditivos (KADAM et al., 2013; SHANKAR et al., 2015). A gramatura se manteve constante para as diferentes formulações (Tabela 4.9) e foi

próxima a $9,7 \text{ g cm}^{-2} \times 10^{-3}$. Não houve relação entre a espessura encontrada com a gramatura. Henrique, Cereda, & Sarmento (2008), obtiveram uma gramatura de $45,8 \pm 0,8 \text{ g cm}^{-2} \times 10^{-3}$ em filmes à base de amido de mandioca modificado e $4,09 \pm 0,01 \text{ g cm}^{-2} \times 10^{-3}$ para o PVC. Da mesma forma que ocorreu com os filmes à base de soro de leite, um aumento na espessura do filme provocou um aumento da opacidade do filme (MALI et al., 2004), conforme observado com os filmes contendo quitosana e nano-quitosana.

Tabela A.2 Espessura, gramatura e transparência para as diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina, sem e com adição de quitosana e de nano-quitosana.

Filme	Espessura (μm)	Gramatura (g/cm^2) $\times 10^3$	Opacidade (A/mm)
C3G30Gel3	$87,93 \pm 6,39^b$	$9,5 \pm 0,6^a$	$2,39 \pm 0,21^b$
C3G30Gel3N	$108,70 \pm 13,45^a$	$10,2 \pm 0,2^a$	$2,66 \pm 0,47^{a,b}$
C3G30Gel3Q	$107,90 \pm 20,61^a$	$9,3 \pm 0,7^a$	$3,60 \pm 0,15^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Valores de solubilidade de água dos filmes à base de WPC e gelatina, com diferentes formulações, estão apresentados na Tabela A.3. A solubilidade em água manteve-se constante e próxima a 40,5 %. Para todas as formulações, a integridade dos filmes foi mantida após 24 h de imersão em água. A umidade não sofreu alterações com a incorporação dos aditivos e manteve-se próxima a 22 %. Pérez et al. (2016) para filmes à base de WPC (8 % m/m) e glicerol (4 % m/m), obtiveram solubilidade em água de $41,1 \pm 2,8$ % e umidade de $27,9 \pm 2,8$ %. Jiang, Li, Chai, & Leng (2010) encontraram solubilidade de $25,1 \pm 1,3$ % e umidade de $25,7 \pm 1,1$ % para filmes à base de WPI (5 % m/m), gelatina suína (5 % m/m) e glicerol (0,4 g de glicerol por g de proteína). Silva et al. (2016) obtiveram uma solubilidade de $62,04 \pm 0,74$ % para películas à base de WPI (5 % m/m) e glicerol (2 % m/m). O estudo da solubilidade em etanol tem por finalidade avaliar a solubilidade dos filmes em solventes apolares. Assim como em água, os filmes se mantiveram íntegros após 24 h imersos em etanol. A adição de quitosana ou de nano-quitosana não interferiu neste parâmetro. Apesar de uma elevada solubilidade em água, os filmes apresentaram baixa solubilidade em etanol, próxima a 11 %.

Tabela A.3 Solubilidade em água, solubilidade em etanol e umidade de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina.

Filme	Solubilidade em água (%)	Solubilidade em etanol (%)	Umidade (%)
C3G30Gel3	$39,86 \pm 1,18^a$	$8,30 \pm 4,37^a$	$17,26 \pm 1,27^a$
C3G30Gel3N	$40,02 \pm 1,74^a$	$11,69 \pm 0,77^a$	$25,26 \pm 5,55^a$
C3G30Gel3Q	$41,69 \pm 0,03^a$	$13,96 \pm 0,46^a$	$24,58 \pm 6,74^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Na Figura A.1 estão apresentados os ângulos de contato dos filmes à base de soro do leite e gelatina, sem e com a adição de quitosana ou de nano-quitosana.

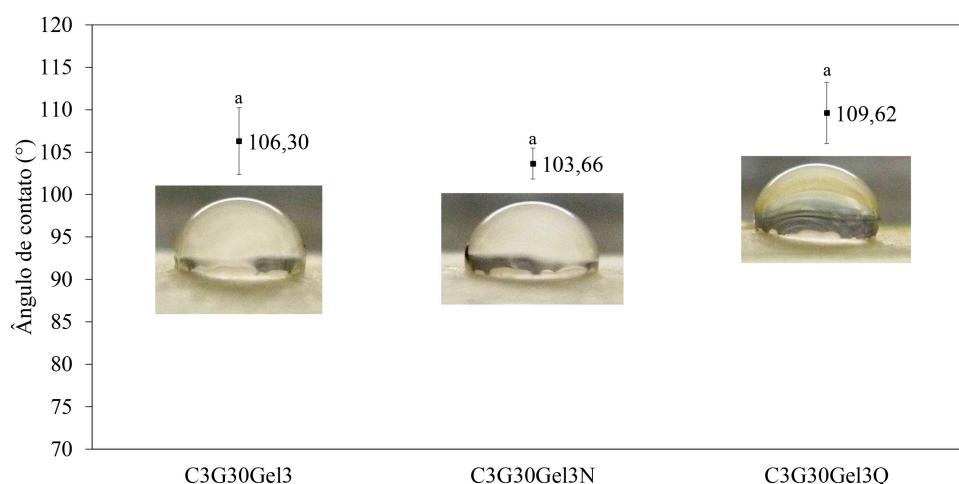


Figura A.1 Ângulo de contato de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Todas as amostras apresentaram caráter hidrofóbico e começaram a inchar imediatamente após a deposição da gota de água, não sendo possível a determinação do ângulo de contato com o decorrer do tempo. O inchaço local ocorreu provavelmente em função da presença do glicerol, em decorrência de sua higroscopicidade (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). Os ângulos obtidos foram superiores aos encontrados na literatura para filmes à base de WPI, WPC e gelatina (BAHRAM et al., 2014; FLAKER et al., 2014; JAFARI et al., 2015; KADAM et al., 2013; KOKOSZKA et al., 2010b; RAMOS et al., 2013; WANG et al., 2016). Essa diminuição da hidrofobicidade é decorrente da reticulação causada pelas ligações de hidrogênio, que envolvem o grupo OH livre da gelatina (LE TIEN et al., 2000).

A.4 Propriedades morfológicas

Na Figura A.2 estão apresentadas as fotomicrografias da seção transversal das amostras dos filmes à base de WPC e gelatina, sem e com a adição de quitosana ou de nano-quitosana. As fotomicrografias obtidas por MEV revelaram uma matriz irregular e com boa integridade para os filmes à base de WPC e gelatina, indicando compatibilidade entre os componentes. Esse resultado sugere que a quitosana e a nano-quitosana estão uniformemente dispersas na matriz dos biopolímeros.

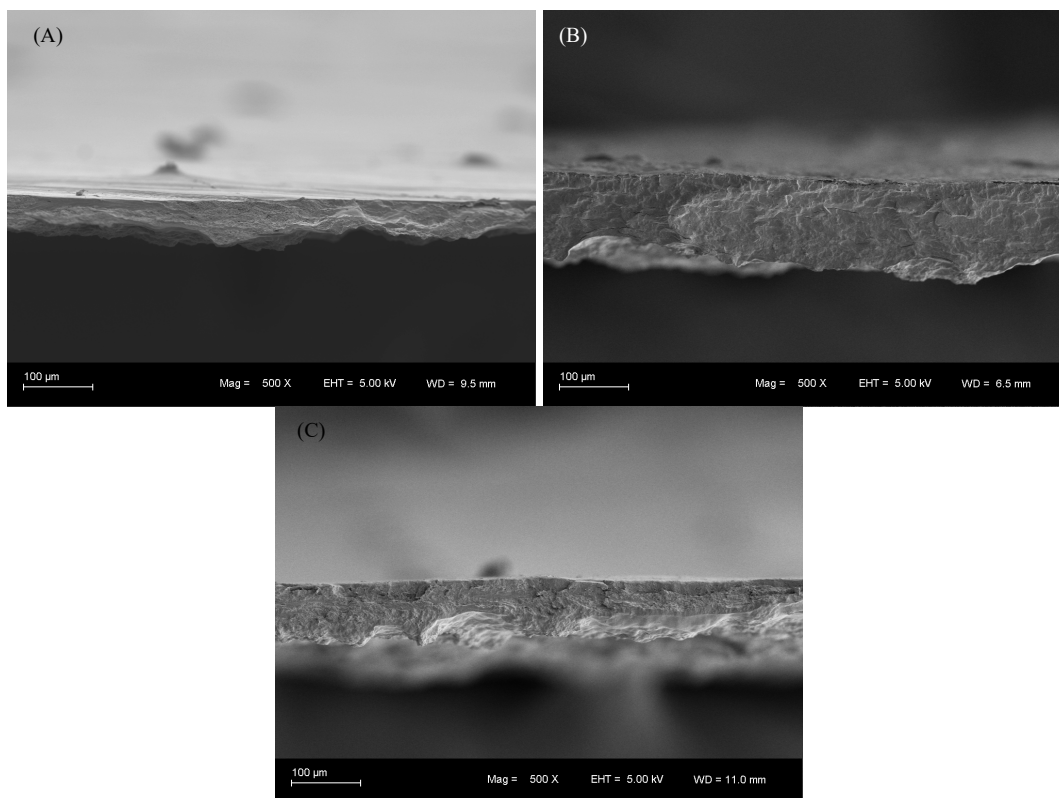


Figura A.2 Fotomicrografias de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) C3G30Gel3, (B) C3G30Gel3N e (C) C3G30Gel3Q.

Pequenas discontinuidades através dos filmes são atribuídas ao glicerol e algumas impurezas originalmente presentes no material ou incompleta solubilidade de alguns grãos (KUREK; GALUS; DEBEAUFORT, 2014). As imagens de MEV não mostraram diferenças microestruturais significativas entre as amostras analisadas.

A.5 Caracterização química

Os espectros de FTIR obtidos para os filmes à base de WPC e gelatina, sem e com a adição de quitosana ou de nano-quitosana estão apresentados na Figura A.3. Todas as amostras de filmes apresentaram bandas características em regiões próximas a 1630, 1530 e 1230 cm^{-1} , correspondendo à amida I, amida II e amida III, respectivamente (PEREDA et al., 2011). A amida I, banda intensa próxima a 1630 cm^{-1} , é sensível à estrutura secundária da proteína e representa principalmente a vibração de estiramento C=O do grupo amida (GILBERT et al., 2005). A banda próxima a 1530 cm^{-1} é devido à vibração de flexão do grupo N-H. As bandas próximas à 1450 a 1230 cm^{-1} indicam vibrações de alongamento C-N e N-H (PEREDA et al., 2011). A banda situada no número de onda de 1037 cm^{-1} é devida às interações entre o plastificante (grupo OH do glicerol) e os outros componentes do filme (HOQUE et al., 2011), indicando que houve interação entre o plastificante e as proteínas. A região espectral de 800 a

1150 cm^{-1} pode ser atribuída as bandas de absorção do glicerol correspondentes às vibrações das ligações C-C e C-O (RAMOS et al., 2013).

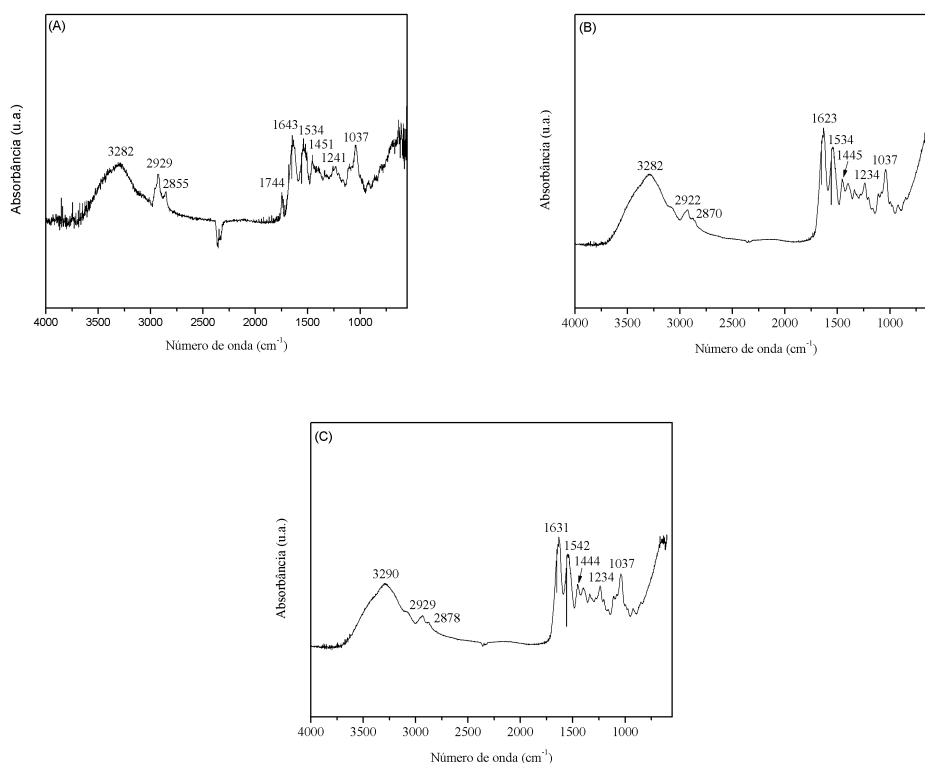


Figura A.3 Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das amostras (A) C3G30Gel3, (B) C3G30Gel3N e (C) C3G30Gel3Q.

A incorporação da quitosana e da nano-quitosana mostrou apenas um efeito aditivo nas bandas características, aumentando sua intensidade, porém sem a presença de novas interações significativas. Esses resultados indicam que a quitosana e a nano-quitosana parecem estar simplesmente dispersas na película à base de WPC e gelatina.

A.6 Propriedades de barreira

Os valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) das diferentes formulações à base de WPC e gelatina são mostrados na Tabela A.4. A PVA não se alterou com a incorporação de aditivos e se manteve próxima de 1,4 $\text{g mm/m}^2 \text{ h kPa}$. A PVA dos filmes preparados com biopolímeros dependem da sua espessura. O efeito da espessura pode ser explicado pela natureza hidrofílica da maioria dos biopolímeros, uma vez que a difusividade do vapor de água destes materiais é dependente da umidade (ABUGOCH et al., 2011; MCHUGH; AVENABUSTILLOS; KROCHTA, 1993; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2009). As diferenças de umidade relativa devem ser consideradas quando se comparam valores de PVA (McHugh et al., 1993).

Tabela A.4 Permeabilidade ao vapor de água de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina, sem e com a adição de quitosana e de nano-quitosana.

Filme	Permeabilidade ao vapor de água (g mm/h kPa m ²)
C3G30Gel3	1,168 ± 0,077 ^a
C3G30Gel3N	1,493 ± 0,439 ^a
C3G30Gel3Q	1,492 ± 0,118 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Na literatura são encontrados diferentes valores de PVA. Alguns exemplos podem ser citados: Bahram et al. (2014) obtiveram uma PVA de $0,93 \pm 0,09$ g mm/m² h kPa para películas à base de WPC (8 % m/v) e glicerol (8 % m/v) com $0,31 \pm 0,11$ mm de espessura e sob umidade relativa de 0 a 75 %; Banerjee & Chen (1995) avaliaram a PVA de filmes à base de WPC (10 % mt) e glicerol (5 % mt) com 0,110 mm de espessura e sob UR de $0-55 \pm 3$ % e encontraram um valor de $10,64$ g mm/m² h kPa; Soazo et al. (2011) para filmes à base de WPC (8 % m/m), glicerol (proporção WPC:glicerol de 3:1 m/m base de sólidos secos), sorbato de potássio (para se obter uma concentração final de 0,12 % m/m base de sólidos secos) e cera de abelha (40 % m/m base de sólidos), com espessura de 0,154 mm, obtiveram uma PVA de aproximadamente $3,5$ g mm/m² h kPa sob UR de 58-100 %; Wang, Auty, & Kerry (2010) obtiveram uma PVA de $2,00 \pm 0,45$ g mm/m² h kPa para filmes à base de proteína isolada do soro de leite (4 % mt), gelatina (4 % mt), alginato de sódio (1 % mt) e glicerol (razão de 1:2 m:m de glicerol:massa de pó) e as análises de PVA foram conduzidas em umidade relativa de 100 a 50 ± 3 %; Pereda et al. (2011) para filmes à base de quitosana (2 % m/V), glicerol (28 % mt (baseado na massa seca de quitosana) e gelatina (2,5 % m/V), obtiveram valores de PVA de $0,400 \pm 0,072$ g mm/m² h kPa sob UR de $65-0 \pm 2$ %. As diferenças encontradas podem estar relacionadas a diferentes composições dos filmes.

A.7 Análises térmicas

Em todos os termogramas de DSC das amostras dos filmes houve a ocorrência de apenas uma T_g (Tabela A.5), não sendo detectados bandas relacionadas com a fusão ou a cristalização na faixa de temperatura avaliada (25°C a 110°C), o que sugere que as amostras se encontram no estado amorfo. Os termogramas também indicam que o plastificante, o WPC e a gelatina permaneceram um material homogêneo em todo o ciclo de arrefecimento e aquecimento, uma vez que não foi observada separação de fases (T_g separadas ou picos de fusão e de cristalização). Se polímeros e plastificantes ou a mistura de dois polímeros são imiscíveis, a mistura irá apresentar dois valores de T_g correspondente às duas fases puras (GHANBARZADEH; OROMIEHI, 2009). Esses resultados sugerem que houve compatibilidade do glicerol com o

WPC e a gelatina e o processo de plastificação foi eficaz. Os valores de T_g encontrados para as amostras de filmes foram inferiores aos informados por Ramos et al. (2013), de $43,6 \pm 0,6$ °C para filmes à base de WPC (10 % m/m) e glicerol (40 % m/m de proteína seca). Porém, de acordo com Osés, Fernández-Pan, Mendoza, & Maté (2009), a T_g de filmes à base de WPI deve se situar entre 50 e 20 °C, diminuindo com o aumento do teor de glicerol.

Tabela A.5 Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo (porcentagem de resíduo até 800 °C) de diferentes formulações de filmes à base de WPC e gelatina com e sem adição de quitosana ou de nano-quitosana.

Amostra	T_g (°C)	T_d (°C)	T_{max} (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%) _{800°C}
C3G30Gel3	33,9	288,2	346,0	39,6	19,2
C3G30Gel3N	34,0	284,8	346,5	37,7	19,2
C3G30Gel3Q	34,1	256,7	329,2	50,9	18,1

Os termogramas de TGA e de DTG dos filmes à base de WPC e gelatina com e sem quitosana ou nano-quitosana estão apresentados na Figura A.4. A temperatura inicial de decomposição (T_d), temperatura máxima de degradação (T_{max}), perda de massa e resíduo são apresentados na Tabela A.5. Todos os filmes à base de WPC e gelatina apresentaram três etapas de decomposição térmica. Uma perda de massa inicial de aproximadamente 15% (m/m) foi observada na faixa de 130 a 170°C. Esta perda inicial pode estar relacionada com a perda de água livre adsorvida sobre as películas (NUTHONG; BENJAKUL; PRODPRAN, 2009; RHIM; PARK; HA, 2013; RHIM; WANG; HONG, 2013; SU et al., 2010). Os filmes iniciaram a decomposição entre 250 e 290 °C, que pode ser atribuída à decomposição do glicerol incorporado à matriz do filme (SHANKAR et al., 2015), estando de acordo com a T_d do glicerol (260,7 °C). Na última etapa de degradação, os filmes apresentaram uma perda acentuada de massa entre 250 e 800 °C, que está principalmente associada à degradação do WPC e da gelatina, estando de acordo com a T_d desses componentes (292,1 °C e 295,6 °C, respectivamente). Esta etapa também está associada com a degradação oxidativa dos resíduos de carbono formados durante a degradação do WPC e da gelatina. Comportamento semelhante é encontrado na literatura (AZEVEDO et al., 2015; BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003; KADAM et al., 2013; RAMOS et al., 2013; SHANKAR et al., 2015).

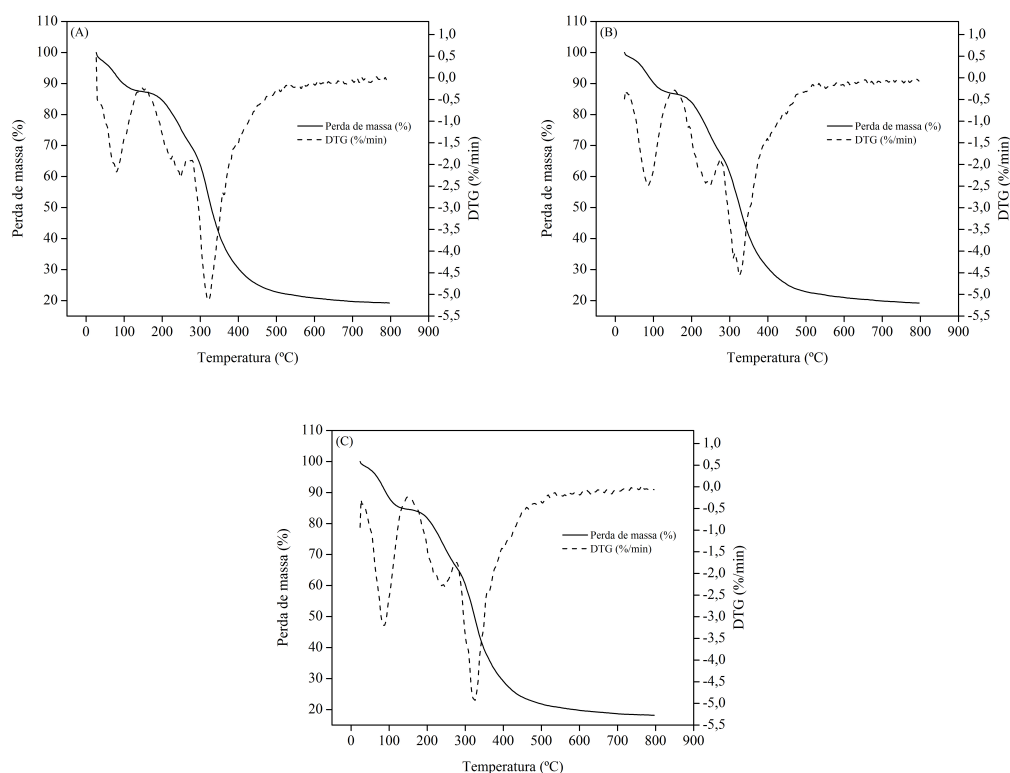


Figura A.4 Termogramas TGA e DTG dos filmes com diferentes formulações à base de WPC e gelatina, com e sem quitosana ou nano-quitosana: (A) C3G30Gel3, (B) C3G30Gel3N e (C) C3G30Gel3Q.

Organizando as formulações em ordem crescente de estabilidade térmica tem-se a seguinte relação: C3G30Gel3Q < C3G30Gel3N < C3G30Gel3. Após a decomposição térmica, o resíduo dos filmes foi de aproximadamente 20 % (Tabela 4.12). Por fim, os termogramas mostraram que todos os filmes exibem uma única T_d , o que é uma indicação de boa compatibilidade entre o WPC, a gelatina e o glicerol (RAMOS et al., 2013).

A.8 Seleção da melhor formulação

Os filmes à base de proteína concentrada do soro de leite apresentaram propriedades muito semelhantes. Porém, apesar da formulação C3G30Gel3 apresentar melhores propriedades mecânicas, menor espessura e maior estabilidade térmica, através de testes preliminares, foi observado que as formulações com adição de quitosana indicaram um retardamento no crescimento microbiano. Desta forma, a melhor formulação com as melhores propriedades para aplicação como embalagem de alimentos selecionada foi a C3G30Gel3Q.

Apêndice B

Caracterizações das demais formulações dos filmes à base de soro de leite e gelatina e dos filmes à base de WPI

Nesta seção serão apresentadas as caracterizações morfológicas, caracterização química e análise térmica das formulações à base de soro de leite e gelatina e formulações à base de WPI que não foram incluídas nos resultados e discussão por serem semelhante as demais.

Propriedades morfológicas

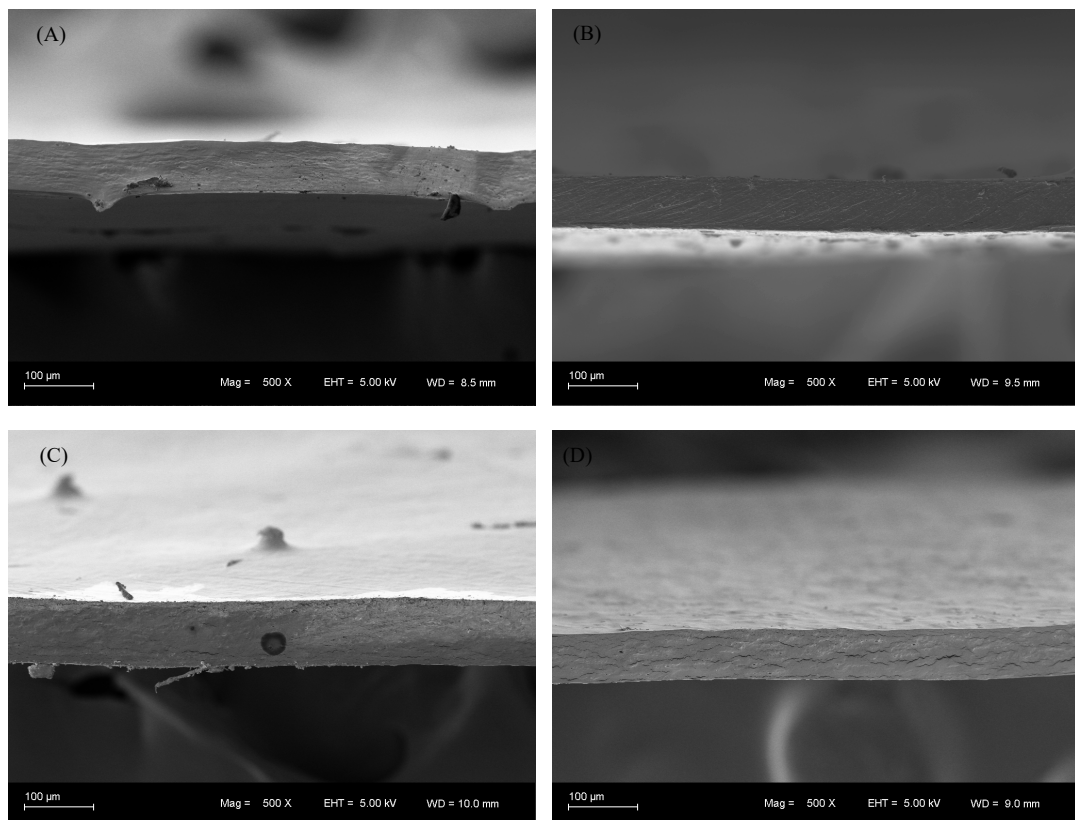


Figura B.1 Fotomicrografias de diferentes formulações de filmes à base de soro de leite e gelatina, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) S3G10Gel3N, (B) S3G20Gel3, (C) S3G20Gel3N e (D) S3G10Gel3Q.

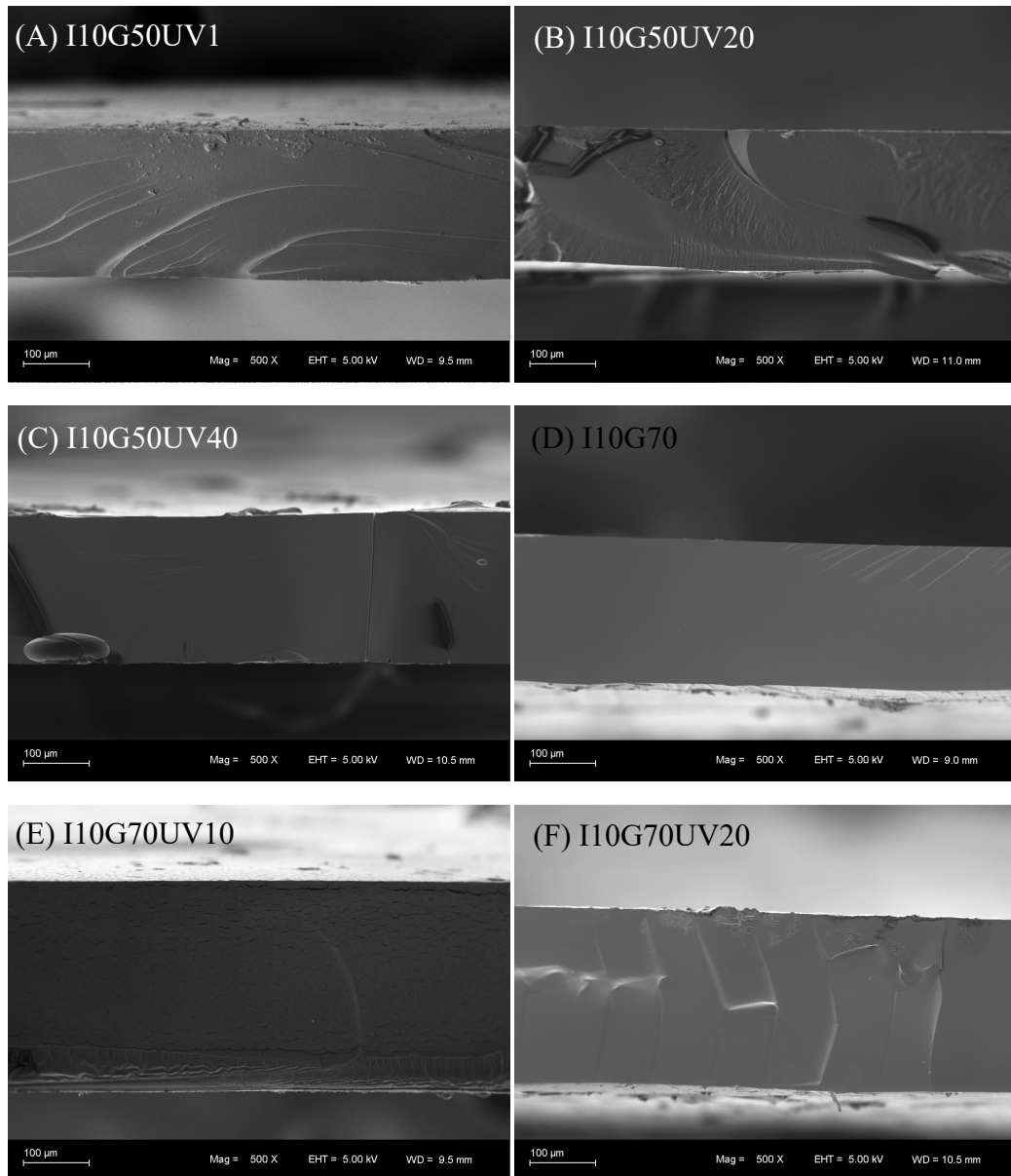


Figura B.2 Fotomicrografias MEV de diferentes formulações de filmes à base de WPI, glicerol e OSU, a 5 kV com magnificação de 500 ×. (A) I10G50UV1, (B) I10G50UV20, (C) I10G50UV40, (D) I10G70, (E) I10G70UV10 e (F) I10G70UV20.

Caracterização química

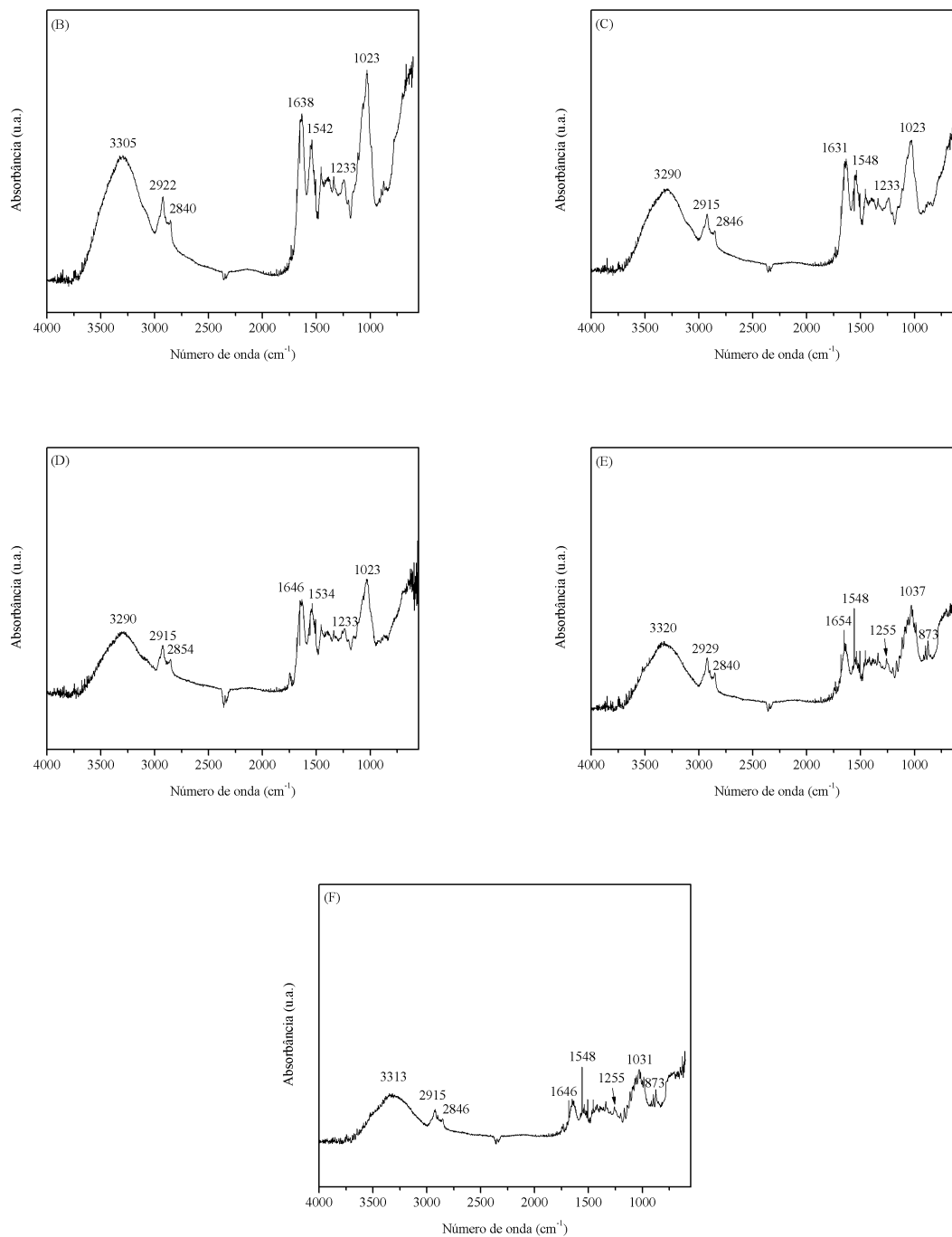


Figura B.3 Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para diferentes formulações filmes à base de soro de leite e gelatina. (B) S3G10Gel3N, (C) S3G10Gel3Q, (D) S3G20Gel3, (E) S3G20Gel3N, (F) S3G10Gel3Q.

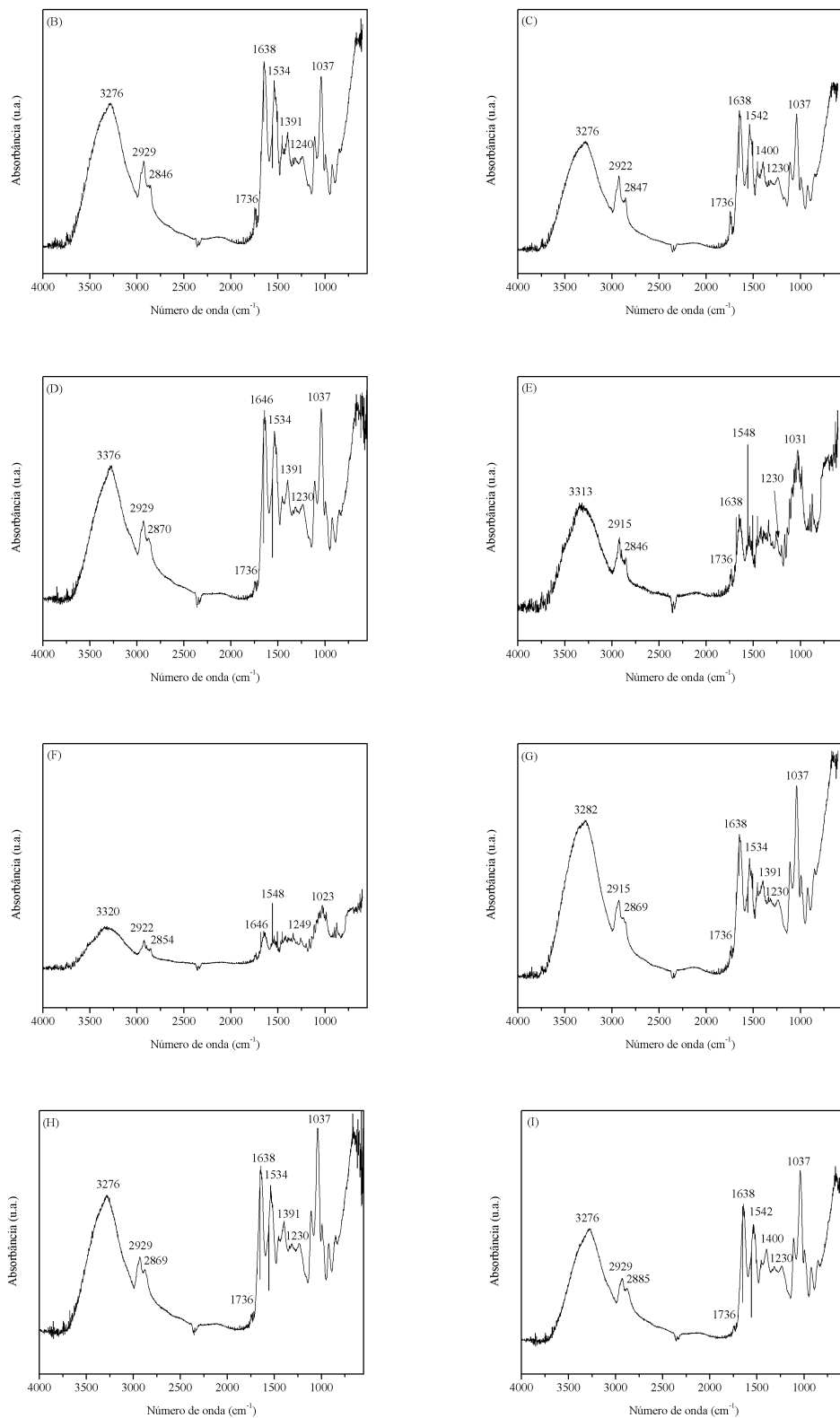


Figura B.4 Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para os filmes com diferentes formulações à base de WPI, glicerol e OSU. (B) I10G50UV1, (C) I10G50UV10, (D) I10G50UV20, (E) I10G50UV40, (F) I10G70, (G) I10G70UV10, (H) I10G70UV20 e (I) I10G70UV40.

Análise térmica

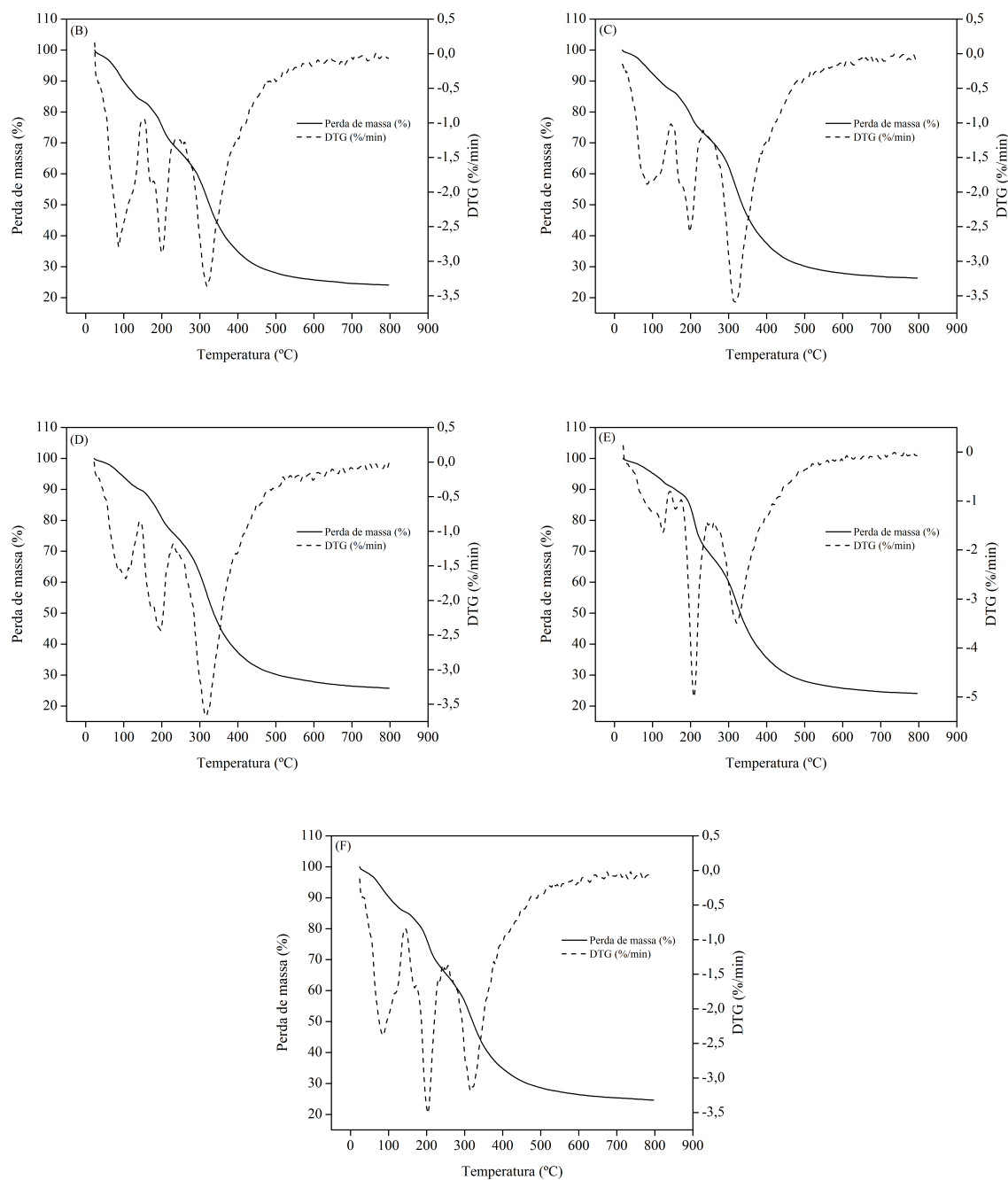


Figura B.5 Termogramas TGA e DTG para diferentes formulações de filmes à base de soro de leite e gelatina sem e com quitosana ou nano-quitosana. (A) S3G10Gel3, (B) S3G10Gel3N, (C) S3G10Gel3Q, (D) S3G20Gel3, (E) S3G20Gel3N, (F) S3G10Gel3Q.

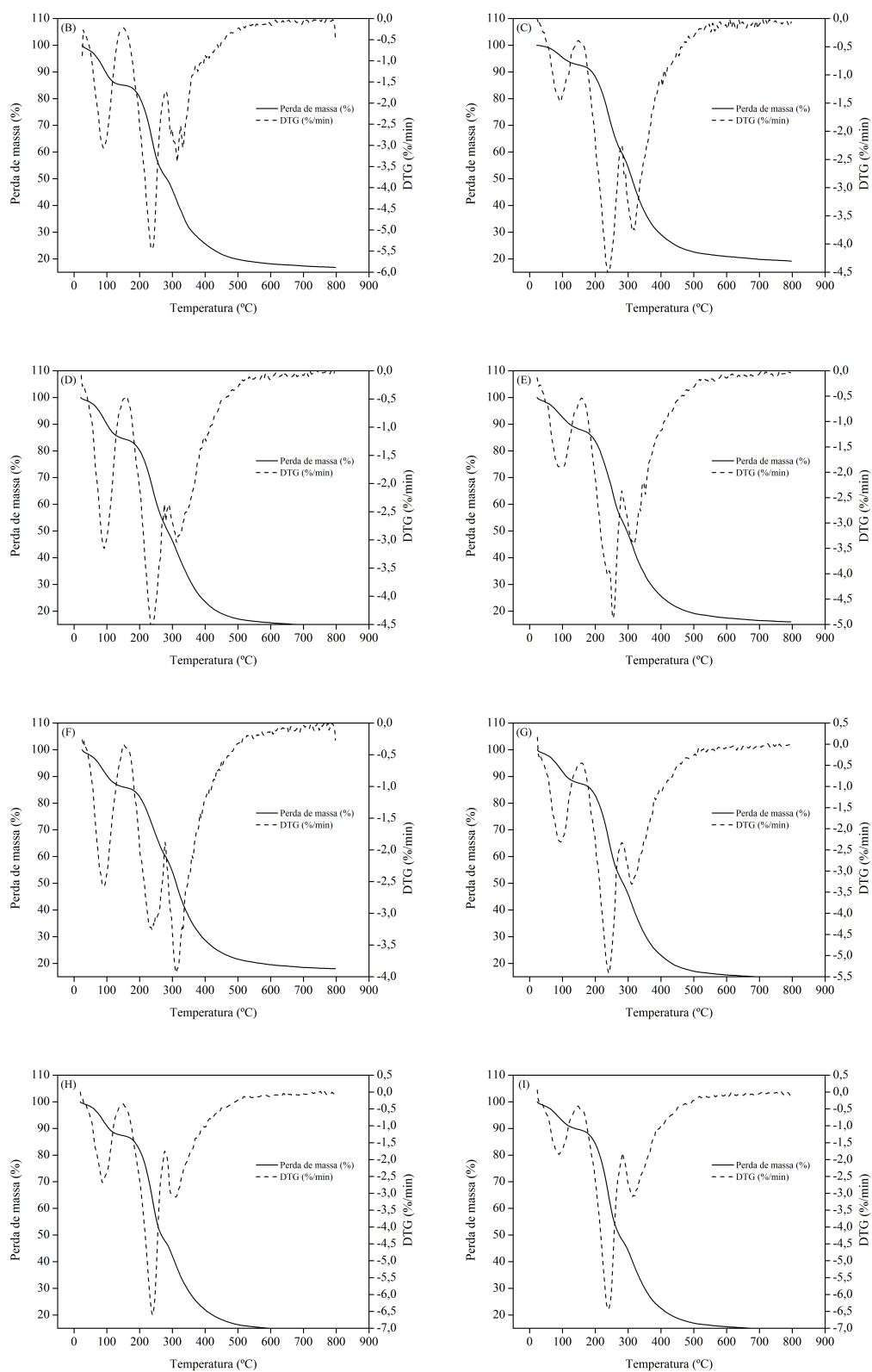


Figura B.6 Termogramas TGA e DTG das amostras de filmes com diferentes formulações de filmes à base de WPI, glicerol e OSU. (B) I10G50UV1, (C) I10G50UV10, (D) I10G50UV20, (E) I10G50UV40, (F) I10G70, (G) I10G70UV10, (H) I10G70UV20 E (I) I10G70UV40.

Apêndice C

Análises termogravimétricas - envelhecimento acelerado

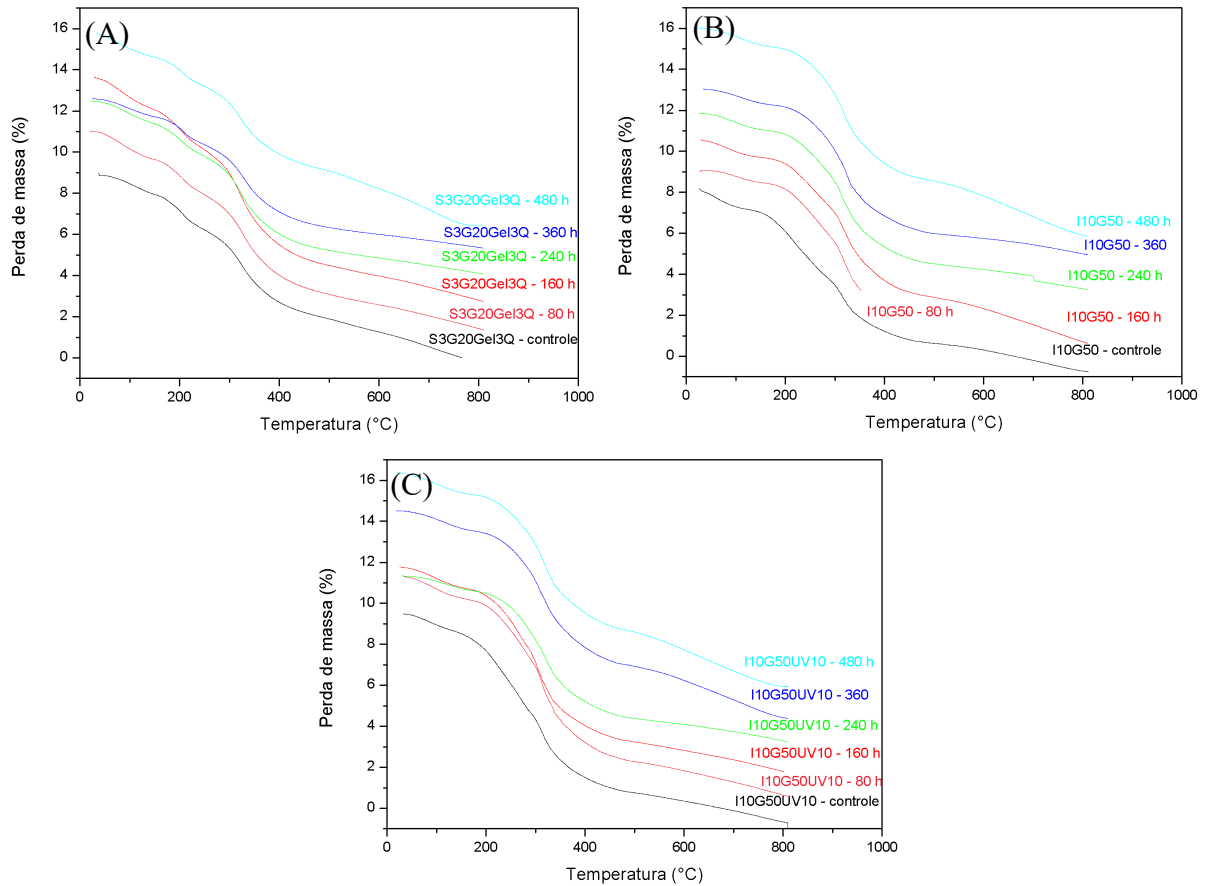


Figura C.1 Análises termogravimétricas das amostras (a) S3G20Gel3Q, (b) I10G50 e (c) I10G50UV20, antes e após exposição ao envelhecimento acelerado por períodos de 80, 160, 240, 360 e 480 horas.

Apêndice D

Análise estatística – teste em alimento

Tabela D.1 Análise estatística dos dados da perda de massa das amostras de queijo minas frescal no teste de alimento direto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	PVC	Sem recobrimento
2	$22,02 \pm 1,60^a$	$14,82 \pm 0,75^b$	$21,36 \pm 1,00^a$	$1,06 \pm 0,18^d$	$7,07 \pm 0,88^c$
6	$38,14 \pm 1,28^a$	$36,75 \pm 1,92^a$	$36,14 \pm 0,86^a$	$2,17 \pm 0,20^c$	$24,34 \pm 1,66^b$
10	$44,62 \pm 1,16^a$	$43,41 \pm 1,99^a$	$42,11 \pm 0,85^a$	$4,90 \pm 0,33^b$	$41,76 \pm 1,18^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela D.2 Análise estatística dos dados da perda de massa das amostras de queijo minas frescal no teste de alimento indireto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	PVC	Sem recobrimento
2	$0,68 \pm 0,02^c$	$3,31 \pm 0,29^b$	$3,69 \pm 0,40^b$	$1,06 \pm 0,18^c$	$7,07 \pm 0,88^a$
6	$0,14 \pm 0,02^e$	$7,53 \pm 0,02^b$	$7,09 \pm 0,19^b$	$2,17 \pm 0,20^d$	$24,34 \pm 1,66^a$
10	$4,56 \pm 0,32^c$	$18,76 \pm 0,77^b$	$22,50 \pm 3,26^b$	$4,90 \pm 0,33^c$	$41,76 \pm 1,18^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela D.3 Análise estatística dos dados da acidez total titulável das amostras de queijo minas frescal no teste de alimento direto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	PVC	Sem recobrimento
0	$30,72 \pm 0,38^a$	$30,72 \pm 0,38^a$	$30,72 \pm 0,38^a$	$30,72 \pm 0,38^a$	$30,72 \pm 0,38^a$
2	$17,88 \pm 0,47^d$	$34,74 \pm 0,52^a$	$34,81 \pm 0,60^a$	$25,83 \pm 1,48^c$	$30,66 \pm 2,01^b$
6	$35,12 \pm 0,21^b$	$35,72 \pm 0,69^b$	$28,74 \pm 0,57^c$	$29,66 \pm 2,59^{c-f}$	$39,98 \pm 2,01^a$
10	$44,19 \pm 2,32^a$	$38,92 \pm 0,27^{b,c}$	$37,07 \pm 1,34^{c,d}$	$41,54 \pm 0,42^{a,b}$	$33,83 \pm 1,27^d$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela D.4 Análise estatística dos dados da acidez total titulável das amostras de queijo minas frescal no teste de alimento indireto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	PVC	Sem recobrimento
0	$27,29 \pm 1,55^b$	$27,29 \pm 1,55^b$	$27,29 \pm 1,55^b$	$30,72 \pm 0,38^a$	$30,72 \pm 0,38^a$
2	$20,40 \pm 2,22^c$	$22,97 \pm 1,50^{b,c}$	$20,03 \pm 1,38^c$	$25,83 \pm 1,48^{a,b}$	$30,66 \pm 2,01^a$
6	$37,53 \pm 2,30^a$	$29,23 \pm 1,37^b$	$26,95 \pm 2,09^b$	$29,66 \pm 2,59^b$	$39,98 \pm 2,01^a$
10	$44,19 \pm 2,32^a$	$39,25 \pm 1,54^{b,c}$	$37,07 \pm 1,34^{c,d}$	$41,54 \pm 0,42^{a,b}$	$33,83 \pm 1,27^e$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela D.5 Análise estatística dos dados de pH das amostras de queijo minas frescal no teste de alimento direto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	PVC	Sem recobrimento
0	$6,27 \pm 0,02^a$	$6,27 \pm 0,02^a$	$6,27 \pm 0,02^a$	$6,27 \pm 0,02^a$	$6,27 \pm 0,02^a$
2	$6,55 \pm 0,03^b$	$6,36 \pm 0,03^c$	$6,27 \pm 0,02^d$	$6,61 \pm 0,02^a$	$6,66 \pm 0,02^a$
6	$6,59 \pm 0,02^b$	$6,33 \pm 0,02^d$	$6,43 \pm 0,02^c$	$6,68 \pm 0,03^a$	$6,64 \pm 0,03^{a,b}$
10	$6,58 \pm 0,02^b$	$6,26 \pm 0,03^c$	$6,22 \pm 0,02^c$	$6,69 \pm 0,02^a$	$6,54 \pm 0,02^b$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela D.6 Análise estatística dos dados de pH das amostras de queijo minas frescal no teste de alimento indireto no período de 10 dias de armazenamento sob refrigeração (5 ± 1 °C e 23 ± 2 % de UR).

Tempo (dias)	S3G20Gel3Q	I10G50	I10G50UV10	PVC	Sem recobrimento
0	$6,75 \pm 0,03^a$	$6,75 \pm 0,03^a$	$6,75 \pm 0,03^a$	$6,27 \pm 0,02^b$	$6,27 \pm 0,02^b$
2	$6,67 \pm 0,02^a$	$6,71 \pm 0,02^a$	$6,61 \pm 0,02^b$	$6,61 \pm 0,02^b$	$6,66 \pm 0,02^{a,b}$
6	$6,65 \pm 0,03^b$	$6,66 \pm 0,03^b$	$6,75 \pm 0,01^a$	$6,68 \pm 0,03^{a,b}$	$6,64 \pm 0,03^b$
10	$6,52 \pm 0,03^{b,c}$	$6,48 \pm 0,01^c$	$6,57 \pm 0,03^b$	$6,69 \pm 0,02^a$	$6,54 \pm 0,02^b$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).