



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
COMESTÍVEIS BIODEGRADÁVEIS A BASE DE PROTEÍNAS
MIOFIBRILARES DE ORIGEM BOVINA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Silvia Maria Almeida de Souza** aprovada pela Comissão Julgadora em 31 de julho de 2001.

Campinas, 31 de julho de 2001

Profa. Dra. **Florencia C. Menegalli**
Presidente da Banca

SÍLVIA MARIA ALMEIDA DE SOUZA
Mestre em Engenharia de Alimentos

Profa. Dra. **FLORENCIA CECILIA MENEGALLI**
Orientadora
Prof. Dr. **PAULO JOSÉ DO AMARAL SOBRAL**
Co-orientador

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas – SP
2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
So89e
V. Ex.
TOMBO BC 46373
PROC. 16-392101
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 14/09/01
N.º CPD



UNICAMP

CM00159802-1

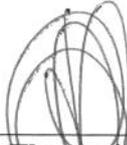
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

So89e Souza, Sílvia Maria Almeida de
Elaboração e caracterização de filmes comestíveis
biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares bovina / Sílvia
Maria Almeida de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

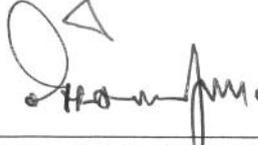
Orientador: Florencia Cecilia Menegalli
Co-orientador: Paulo José do Amaral Sobral
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Proteínas. II. Biofilme. III. Embalagens. I. Menegalli,
Florencia Cecilia. II. Sobral, Paulo José do Amaral.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Florencia Cecilia Menegalli
Orientadora - UNICAMP



Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos
UNICAMP



Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger
UNICAMP



Profa. Dra. Catarina Abdalla Gomide
USP



Profa. Dra. Maria Aparecida Mauro
UNESP

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
UNICAMP

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
UNICAMP

1906T006

AGRADECIMENTOS

Sou grata à Profa. Dra. Florencia Cecilia Menegalli pela sua orientação e ao Co-orientador Prof. Paulo José do Amaral Sobral por ter me sugerido o presente trabalho e pela paciência e compreensão de ambos.

Estou em débito com o Prof. Carlos Raimundo Ferreira Grosso por ter me concedido o uso de Laboratório pertencente ao Departamento de Nutrição desta Faculdade.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões apresentadas para a redação final deste trabalho. Em especial à Profa. Maria Aparecida Mauro, pelos comentários atentos e úteis da dissertação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Assis que gentilmente cedeu o uso do Laboratório de Embalagem pertencente ao Departamento de Tecnologia desta Faculdade.

Aos funcionários que direto e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos Ana Lúcia, Alfredo, Andrés, Carla, Paulo, Cléu, Nely, Reinaldo, Mari, Eliana, Flávio, Lyssa, Álvaro, Lia, Zé Guilherme, Eduardo e Jesus pelo companheirismo e preciosos momentos de descontração.

E Àquele que me tem dado oportunidade de viver,

Obrigada.

ÍNDICE

NOMENCLATURA	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
CAPÍTULO 1: BIOFILMES	01
1. INTRODUÇÃO GERAL	03
1.1 BIOFILMES.....	07
1.2 BIOFILMES A BASE DE PROTEÍNAS.....	09
1.3 PROCESSOS DE ELABORAÇÃO.....	09
1.4 PROPRIEDADES DOS FILMES.....	12
1.5 APLICAÇÕES.....	17
2. BIBLIOGRAFIA	20
CAPÍTULO 2: PROTEÍNAS MIOFIBRILARES	25
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 PROTEÍNAS MIOFIBRILARES.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES.....	34
2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DAS PROTEÍNAS.....	37
2.3 AMINOGRAMA.....	37
2.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS.....	41
3.2 ELETROFORESE.....	42
3.3 AMINOGRAMA.....	47
4. CONCLUSÃO	55
5. BIBLIOGRAFIA	56
CAPÍTULO 3: OBTENÇÃO DE BIOFILMES	61
1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE.....	67
2.2 FORMAÇÃO DO FILME.....	67
2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES.....	69
2.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS – FORÇA E DEFORMAÇÃO NA RUPTURA....	73
2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	75
3.1.1 FORÇA DE RUPTURA.....	75

3.1.2 DEFORMAÇÃO NA RUPTURA	79
3.2 SOLUBILIDADE	89
3.3 OPACIDADE	99
3.4 COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA.....	103
3.5 FORMULAÇÃO OTIMIZADA	113
4. CONCLUSÃO.....	114
5. BIBLIOGRAFIA	115

CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES: PROPRIEDADES **119**

1. INTRODUÇÃO.....	121
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	123
2.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE	123
2.2 FORMAÇÃO DO FILME.....	123
2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES.....	123
2.3.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS–FORÇA E DEFORMAÇÃO NA RUPTURA .	123
2.3.2 COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA	124
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
3.1 FORMULAÇÃO ÓTIMA	125
3.1.1 EFEITO DA ESPESSURA SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	127
3.1.2 EFEITOS DA ESPESSURA SOBRE O COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA.....	134
4. CONCLUSÃO.....	139
5. BIBLIOGRAFIA	140

CAPÍTULO 5: MICROESTRUTURA E TRANSIÇÃO VÍTREA **143**

1. INTRODUÇÃO.....	145
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	147
2.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA E FORMAÇÃO DO FILME	147
2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	147
2.3 ANÁLISE DSC	148
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	149
3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	149
3.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	159
4. CONCLUSÃO.....	167
5. BIBLIOGRAFIA	168

CAPÍTULO 6: ISOTERMAS DE SORÇÃO **171**

1. INTRODUÇÃO.....	173
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	175
2.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE	175
2.2 FORMAÇÃO DO FILME.....	175
2.3 ISOTERMAS DE SORÇÃO DE ÁGUA.....	176
2.4 MODELOS DE ISOTERMA DE ADSORÇÃO.....	176
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	177

4. CONCLUSÃO.....	188
5. BIBLIOGRAFIA	189
CAPÍTULO 7: CONCLUSÃO GERAL	191
SUGESTÕES	194
ANEXO A	195
ANEXO B	201
ANEXO C	203
ANEXO D	205

NOMENCLATURA

- A – área (m^2)
Aa e aa – aminoácidos
 a_w – atividade de água
b.s – base seca
b.u – base úmida
Cg – concentração de glicerol (g/100 g de proteína)
c – constante da equação de Guggenheim-Anderson-De Boer
D – deslocamento (mm)
Da - Dalton
 D_s – constante dielétrica do solvente
DSC – calorímetro diferencial de varredura
E – desvio relativo médio (%)
 F - força efetiva de atração entre as cargas + e -
F – força (Mpa, N)
g – massa de água (g)
GAB – modelo matemático de Guggenheim-Anderson-De Boer
k – constante da equação de Guggenheim-Anderson-De Boer
 l_0 – raio inicial (mm)
 m_i – valores experimentais de umidade de equilíbrio
 m_{pi} – valores preditos pelos modelos matemáticos
n – número de observações experimentais
nm – nanometro
p - probabilidade
pI – ponto isoelétrico
PMB – proteínas miofibrilares bovina
PVA – permeabilidade ao vapor de água
r - distância entre as cargas z_1^+ e z_2^-
R – constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ kcal/mol.k}$)

R^2 – coeficiente de correlação

RSM – metodologia de superfície-resposta

SFF – solução formadora de filme

t – tempo (s)

T – temperatura ($^{\circ}\text{C}$, K)

T_m – temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)

T_g – temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)

U_a – unidade de área

UR – umidade relativa (%)

x – espessura do filme (μm)

X – umidade de equilíbrio (g de água/100 g matéria seca)

X_m – umidade da monocamada (g de água/100 g matéria seca)

z_1 e z_2 - cargas antagônicas

ΔP – diferença de pressão de vapor de água

$\Delta l/l_0$ – deformação na ruptura

RESUMO

Pesquisas sobre filmes comestíveis e biodegradáveis a base de biopolímeros surgiram nos últimos tempos devido às considerações ecológicas, aliadas à necessidade de minimização de resíduos sólidos. Estudos com proteínas miofibrilares de peixe demonstraram a capacidade em formar filmes de propriedades funcionais interessantes. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma formulação a base de proteínas miofibrilares de origem bovina (músculo *Semitendinosus*). As proteínas miofibrilares foram extraídas pelo método de centrifugação diferencial, em soluções tampão salinas e posteriormente foram liofilizadas e caracterizadas segundo as análises de teor protéico e de lipídeo, granulometria (0,125 mm), umidade e cinzas, identificação das frações protéicas (SDS-PAGE), identificação das frações protéicas (aminograma), determinação de isothermas de sorção (25 °C) e visualização através de microscopia de varredura. As composições das formulações dos filmes testadas foram calculadas segundo um planejamento experimental fatorial completo de dois níveis (2³), com quatro repetições no ponto central, sendo compostas de água destilada, glicerol como plasticizante (50 a 75 g/100 g proteína), ácido acético como ajustador de pH (2,5 a 3,5), além da proteína (1%). As propriedades funcionais utilizadas para verificar os efeitos dos fatores foram as propriedades mecânicas (força e deformação na ruptura), solubilidade em água, opacidade e permeabilidade ao vapor de água. Com a formulação que apresentou as melhores propriedades funcionais foram estudados, inicialmente, os efeitos da espessura e umidade relativa sobre as propriedades mecânicas força-deformação na ruptura e permeabilidade ao vapor de água. Seguidamente foram realizadas várias análises tais como: análises microestruturais, através de fotografias de microscopia eletrônica de varredura, e a análise do efeito da umidade relativa sobre a temperatura de transição vítrea (T_g) obtida por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a determinação de isothermas de adsorção de água (10, 25, 35 °C). As proteínas miofibrilares liofilizadas apresentaram características adequadas para a formação de filmes, tais como, baixa higroscopicidade com umidade de equilíbrio próximo a 0,8 g água/100 g b.s, a_w=0,84; frações protéicas de alto peso molecular; grande percentual de interação iônica (45,88%, Mol Aa/100 mol Aa) e pontes de hidrogênio (7,22%, Mol Aa/100 mol Aa). As propriedades funcionais dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de

origem bovina foram influenciadas pela concentração de plasticizante: a força na ruptura não foi influenciada pelo plasticizante na faixa estudada; a deformação na ruptura e a permeabilidade ao vapor de água aumentaram com o plasticizante; a solubilidade e a opacidade diminuíram com o aumento do plasticizante. O efeito da espessura (40, 60 e 80 μm) dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina sobre a força na ruptura apresentou um comportamento esperado, aumentou com a espessura, atingiu 20,5 Mpa com 40 μm de espessura e 75% de UR, a 25 $^{\circ}\text{C}$. A deformação na ruptura aumentou com a diminuição da espessura, atingindo 11,2% com 40 μm de espessura e 75% de UR, a 25 $^{\circ}\text{C}$, na faixa estudada. Tanto a força como a deformação teve uma correlação linear com a UR. Os biofilmes resultaram pouco solúveis (da ordem 24%) e de permeabilidade razoável ($0,11 \cdot 10^{-12} \text{ mol.m/s.m}^2.\text{Pa}$), com 40 μm de espessura e 84% UR a 25 $^{\circ}\text{C}$. A microestrutura revelou uma estrutura externa pouco homogênea, porém coesa e densa e uma matriz do filme de proteína fina e compacta, mas com materiais insolúveis, com fendas e canais no interior, sendo estes últimos em direção à superfície do filme. Os termogramas dos biofilmes apresentaram-se semelhantes aos de um sistema gel. A primeira temperatura de transição vítrea (T_g) aparece em torno de -53 $^{\circ}\text{C}$ ($a_w=0,07$, $X=0,32$ g de água/g de matéria seca) e -98 $^{\circ}\text{C}$ para $a_w=0,75$ e $X=0,7$ g de água/g de matéria seca, enquanto, a segunda T_g aparece em torno de -13 $^{\circ}\text{C}$ em baixas a_w , entre 0,07 e 0,65 e diminui a -25 $^{\circ}\text{C}$ para $a_w=0,75$. O aparecimento de duas T_g sugere a heterogeneidade dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina.

SUMMARY

Researches on biodegradable and edible films based on biopolymers appeared on the last years due to environmental considerations allied to the necessity of solids waste minimizations. Studies on fish myofibrillar proteins verify this capability on film forming with interesting functional properties. The objective of this work was to develop a formulation based on myofibrillar bovine proteins (*Semitenidosus* muscle). Myofibrillar proteins were extracted with buffers solutions by differential centrifugation method, and afterwards that material was freeze-dried. Samples were characterized according to protein and lipid content analysis, size (0,125 mm), humidity and ash, identification of proteins fractions (SDS-PAGE), identification of proteins fractions (aminograms), sorption isotherm determination (25°C) and visualization by scanning electronic microscope. Film formulation solutions were tested according to a complete (2^3) factorial experimental design, with four replications on the central point. The composition of the casting solution 1% protein, distilled water, glycerol as plasticizer (50 to 75 g/100 g protein), and acetic acid for pH control (2,5 to 3,5). Several functional properties were measured to verify the reference of composition: mechanical properties (force and punction force), solubility in water, opacity and water vapor permeability. Using best formulation, the mechanical properties and water vapor permeability were studied as a function of thickness and relative humidity. The following analysis were also carried out: macrostructures analysis, by scanned electronic photographs, analysis of the effect of relative humidity over the temperature of glass transition (T_g) obtained by differential scanning calorimeter (DSC) and the determination of water sorption isotherms (10, 25, 30°C). Lyophilized myofibrillar proteins presented suitable characteristics for film forming, as described: low hygroscopicity with equilibrium humidity moisture content (0,8 g water/100g d.b.; $a_w=0,84$) proteins fractions with high molecular weight, high percentage of ionic interactions (45,88% mol Aa/100 mol Aa) and hydrogen bonds (7,22 % mol Aa/100 mol Aa). Biofilms functional properties based on myofibrillar bovine proteins were influenced by plasticizer in the studied range: deformation on rupture and water vapor permeability increased with plasticizer. The effect of thickness (40, 60, 80 μm) of biofilms based on myofibrillar proteins from bovine origin on the rupture force increased with thickness, as expected. It reached 20,5 MPa at 40 μm

and 75% of relative humidity at 25 °C. On the other hand, deformation on rupture decreased with thickness increase, up to 11,2 % at 40 µm of thickness and 75% of relative humidity at 25 °C. Force as well as deformation have a linear correlation with relative humidity. Biofilms were less soluble (about 24%) and showed quite good permeability ($0,11 \cdot 10^{-12}$ mol.m/s.m².Pa with 40 µm thickness and 84% of relative humidity at 25 °C). Microstructure analysis revealed a little homogeneous external structure, but dense and cohesive. Protein film matrix was thin and compact, however presented cracks and interior canals on the direction of the film surface. Biofilms thermograms showed a similar behavior that gel systems. The first glass transition temperature (T_g) appears near -53 °C (a_w=0,07, X=0,32 g of water/g of dried mater) and -98 °C (a_w= 0,75 and X=0,7 g of water/g of dried mater). While the second T_g appears near -13 °C at low water activities, between 0,07 and 0,65, and decrease up to -25 °C at a_w=0,75. The appearance of two T_g suggests the heterogeneity of biofilms based on myofibrillar bovine proteins.

CAPÍTULO 1

BIOFILMES

1. INTRODUÇÃO GERAL

A grande maioria dos alimentos é consumida longe do local de produção. Inúmeras são as técnicas de conservação de alimentos, destacando-se entre os principais processos físicos e químicos e a combinação deles, o uso de aditivos químicos, a salga, a desidratação osmótica e a defumação, entre os processos físicos, a pasteurização, a esterilização comercial, a refrigeração, o congelamento e a secagem. De maneira geral, empregam-se métodos combinados, sendo ainda necessária uma proteção física do alimento através de uma embalagem adequada. A embalagem é importante e necessária ao armazenamento e distribuição dos alimentos.

Atualmente, estão disponíveis no mercado inúmeras opções de embalagens. As mais utilizadas são as rígidas como latas metálicas ou recipientes de vidro, que possuem excelentes propriedades mecânicas e de barreira a gases e ao vapor de água, assegurando a proteção mecânica e microbiológica, no manuseio do alimento. Durante o processamento especificamente, permitem a esterilização do produto na própria embalagem, e ainda condicionam o formato do produto, dando uma estabilidade dimensional. Outro tipo de embalagem é a de material plástico, geralmente sintética, que revolucionou o conceito de embalagens. As diversificações e tipos de materiais e o contínuo desenvolvimento dos setores de matérias-primas, conversão e transformação oferecem uma grande quantidade de opções de embalagens plásticas, satisfazendo a necessidade de custo, conveniência, “marketing”, formatos, transparência, proteção mecânica e físico-química. Apesar de garantirem uma proteção desejada para diversos tipos de produtos, seu inconveniente é não ser biodegradável e de difícil reciclagem (GONTARD & GUILBERT, 1994) tornando-as responsáveis por grande parte de resíduos plásticos, que se acumulam no ambiente.

Nos últimos 30 anos, cresceu o interesse por filmes comestíveis e biodegradáveis também conhecidos como biofilmes. Em parte, esse interesse surgiu devido à necessidade de reduzir o acúmulo de resíduos sólidos não biodegradáveis, que causam distúrbios ecológicos. Outra tendência para desenvolvimento deste tipo de embalagem é o aumento de alimentos de conveniência. As embalagens biodegradáveis e comestíveis surgiram como

solução atenuante deste problema.

Os biofilmes podem ser de dois tipos: coberturas, quando são aplicadas diretamente nas superfícies dos alimentos e filmes, que possuem a capacidade de formar estruturas próprias independentes. Cobertura e filme comestíveis podem ser definidos como uma fina camada contínua de substância alimentícia formada ou depositada no alimento. Essa pode ser ingerida pelo consumidor e também fornece as propriedades de barreiras à umidade e à migração de solutos para o alimento.

As vantagens e desvantagens na utilização e aplicações destes filmes foram revisadas em detalhes por GUILBERT & BIQUET (1989); GUILBERT (1986) e KESTER & FENNEMA (1986). De modo geral, os filmes e coberturas comestíveis apresentam vantagens por serem consumidos junto com o alimento, serem produzidos a partir de componentes biodegradáveis e renováveis, e também por atuarem como suporte de nutrientes e/ou aditivos que melhoram as características nutricionais e organolépticas do alimento. Mas, a principal vantagem desses filmes em relação aos filmes sintéticos é a sua característica biodegradável.

Os primeiros biofilmes foram produzidos a partir de polissacarídeos (celulose e derivados, carboidratos e derivados, gomas, etc) ou de proteínas (gelatina, zeína, glúten etc) que possuem excelentes propriedades mecânicas e ópticas, mas são sensíveis à umidade e possuem alto coeficiente de permeabilidade ao vapor de água. Ao contrário, os filmes compostos de lipídeos (ceras, lipídeos ou derivados) ou poliésteres (poli-D-β-hidroxilbutirato, ácido polilático, etc) apresentam boas propriedades de barreiras ao vapor de água, mas geralmente são opacos e relativamente inflexíveis. O inconveniente é quanto à estabilidade (principalmente de oxidação).

Os filmes a base de proteínas de alto peso molecular são geralmente insolúveis ou pouco solúveis em água, possuem boas propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), enfim possuem características interessantes. Dentre os biopolímeros, as proteínas miofibrilares de peixe, como a sardinha do Atlântico, produzem filmes de propriedades funcionais promissoras, mas ainda aquém dos padrões de filmes sintéticos (CUQ, 1996).

A utilização das proteínas miofibrilares na elaboração de biofilmes implica, inicialmente, na disponibilidade desta macromolécula, que não é encontrada comercialmente, como a maioria das proteínas de origem vegetal. O Brasil por ser um grande produtor de carne bovina, a custo competitivo em relação aos países desenvolvidos, deixa a desejar quanto ao seu aproveitamento, que varia desde o emprego de tecnologia nos processos de preservação ao total desperdício, adicionando ao fato uma agressão ao meio ambiente, com a poluição dos mananciais.

Dessa maneira optou-se pela utilização de proteína miofibrilar bovina, no estudo e na elaboração de biofilmes biodegradáveis e comestíveis.

Este trabalho foi escrito na forma de capítulos, os quais serão descritos resumidamente a seguir.

CAPÍTULO 1: O trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de proteínas miofibrilares de origem bovina para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis, bem como o estudo das propriedades funcionais relacionadas com a formação dos filmes, dentre as quais solubilidade, propriedades mecânicas, propriedades óticas, coeficiente de permeabilidade ao vapor de água. Nesse capítulo, realizou-se uma justificativa da escolha da matéria prima, uma revisão dos principais filmes desenvolvidos a partir de polímeros dando maior enfoque para biofilmes a base de proteínas, bem como os vários mecanismos de formações de biofilmes e suas aplicações.

CAPÍTULO 2: Apresenta-se uma descrição das características estruturais e da composição química do biopolímero (proteínas miofibrilares) sua classificação, frações protéicas e também suas propriedades físico-químicas. A extração das proteínas miofibrilares empregando-se a técnica de centrifugação diferencial com soluções salinas, é descrita. As metodologias usadas nas identificações das frações protéicas e dos aminoácidos constituintes, realizadas por eletroforese em SDS-PAGE e a técnica de cromatografia de troca iônica, também são descritas nesse capítulo.

CAPÍTULO 3: Neste capítulo estão descritos vários testes usados para investigar as melhores condições do processo de elaboração por “casting”, como pH, tempo e

temperatura de solubilização das proteínas miofibrilares extraídas de carne bovina. Descreve-se o planejamento experimental 2³ completo com as variáveis independentes: concentração do plasticizante (Cp), pH e temperatura do tratamento térmico, mantendo-se a espessura do biofilme constante. As variáveis respostas do planejamento foram as propriedades mecânicas (força e deformação na ruptura), solubilidade, opacidade e coeficiente de permeabilidade ao vapor de água. Os resultados analisados com o programa Statistica 5.0 para verificação da formulação ótima são apresentados e discutidos.

CAPÍTULO 4: Neste capítulo é analisada a eficiência de uma série de variáveis sobre os filmes, trabalhando com a formulação otimizada no capítulo anterior. Os efeitos sobre as propriedades mecânicas (força e deformação na ruptura) e do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água, da espessura e da umidade relativa de condicionamento foram determinados. Apresentam-se resultados de força na ruptura, que aumenta à medida que a espessura aumenta e a umidade diminui, verificando-se o contrário com a deformação na ruptura. O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água tende a diminuir com o aumento da espessura.

CAPÍTULO 5: Neste capítulo, apresenta-se a análise da microestrutura do biofilme de formulação ótima com auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o estudo realizado por análise calorimétrica de varredura do biofilme no calorímetro diferencial de varredura (DSC), onde se identificaram as diversas frações de proteína e glicerol separadas e combinadas com a água. Os resultados de microestrutura se mostraram diretamente relacionados aos resultados de análise térmica.

CAPÍTULO 6: Um estudo de determinação de isotermas de adsorção de água das proteínas miofibrilares e também do biofilme de formulação ótima é descrita, demonstrando-se que a adição de plasticizante à proteína, no caso do filme, provocou aumento da adsorção de água. Foi observado o mesmo comportamento de adsorção de água tanto na proteína como no filme, sendo que o último adsorveu maior quantidade de água na mesma atividade de água.

CAPÍTULO 7: Este capítulo é dedicado às conclusões gerais, onde serão analisados os resultados obtidos no presente trabalho, conjuntamente.

1.1 BIOFILMES

O conceito de filmes comestíveis como envoltório de proteção para alimentos foi registrado desde 1950 (GUILBERT, 1986). Nos últimos 30 anos, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos, enfocando a fabricação de coberturas e filmes biodegradáveis e comestíveis (BANKER, 1966; KESTER & FENNEMA, 1986; GENNADIOS et al., 1994; OKAMOTO, 1978). As indústrias alimentícias têm mostrado um crescente interesse nessas embalagens naturais a partir de biopolímeros como proteínas e polissacarídeos, na medida que se tem expectativas de que os filmes a base de biopolímeros proporcionem propriedades similares quando comparados aos filmes de polímeros sintéticos disponíveis no mercado. As vantagens, técnicas de formação, tipos e propriedades de vários filmes foram revisados por DANIELS (1973), GUILBERT (1986), KESTER & FENNEMA (1986), GUILBERT & BIQUET (1989).

A formação de filmes envolve ligações inter e intramoleculares cruzadas entre cadeias de polímeros para formar uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente (KESTER & FENNEMA, 1986; GUILBERT & BIQUET, 1989). O grau de coesão do filme depende da estrutura do polímero, processo de fabricação, parâmetros físicos (temperatura, pressão, diluição e tipo de solvente, técnica de evaporação e aplicação, etc.), e da presença de plasticizante e de aditivo reticulador (GONTARD & GUILBERT, 1994).

A formulação de filmes e coberturas comestíveis deve incluir pelo menos um componente capaz de formar adequadamente uma matriz coesa e contínua. Vários são os componentes usados na fabricação de filmes comestíveis. Entre esses, estão os filmes a base de carboidratos e seus derivados, amido (JOKAY et al., 1967), dextrinas (amido hidrolisado), alginatos (ALLEN et al., 1963) e outras gomas (MARTIN-POLO & VOILLEY, 1990); celulose e seus derivados (PARK et al., 1993; GENNADIOS et al., 1993; CHINNAN et al., 1995; VOJDANI & TORRES, 1990); dentre as proteínas destacam-se o colágeno (GENNADIOS et al. 1994), a gelatina (CARVALHO, 1997; MENEGALLI et al., 1998), zeína do milho (GENNADIOS et al., 1993, 1994), o glúten (GONTARD, 1991; CHERIAN et al., 1995), a caseína (McHUGH et al., 1993; AVENA-BUSTILLOS et al., 1997), a albumina do ovo (GENNADIOS et al. 1996), as proteínas do

soro de leite (BANERJEE & CHEN, 1995), as proteínas de soja (STUCHELL & KROCHTA, 1994; OKAMOTO, 1978), as proteínas do arroz (GNANASAMBANDAM et al., 1997; GENNADIOS & WELLER, 1994) e as proteínas miofibrilares de peixe (CUQ, 1996; MONTERREY, 1998). Outro filme estudado (KAMPER & FENNEMA, 1985) e pouco comum constitui-se de misturas de ácido palmítico e esteárico com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC),

Vários estudos confirmam o efeito do pH na solubilidade de diferentes macromoléculas nos processos de formações de filmes. Assim, p.e. proteínas extraídas de farelo de arroz tiveram melhor solubilidade a pH 9,5 (GNANASAMBANDAM et al, 1997). Isto se deve ao maior teor de aminoácidos hidrofóbicos, o qual confere maior estabilidade para proteína neste pH e que pode ser evidenciado quando ocorre a mudança água para álcool, provocando uma diminuição de energia livre das cadeias laterais de aminoácidos não-polares. Esta mudança auxilia no enfraquecimento da estrutura terciária (interações hidrofóbicas) com uma concomitante formação da α -hélice.

Por outro lado, BANERJEE & CHEN (1995) utilizando concentrado protéico de soro, observaram maior solubilidade em solução a pH 6,6. A solução neste pH produziu filmes uniformes. Para a formação da solução formadora de filme a base de proteína de soja, o pH necessário para dissolvê-la completamente varia entre as condições de pH=6,2 e de pH=10,2, a solubilidade da proteína de glúten requer condição alcalina, pH>10,5 e ácida, pH<5, como observado por WATANABLE & OKAMOTO (citado por OKAMOTO, 1978). Entretanto, GONTARD (1991) obteve maior solubilidade da proteína de glúten a pH 5,0. A variação de solubilidade das proteínas na solução formadora de filmes, em função do pH deve-se aos diversos tipos de interações provocadas pelos aminoácidos constituintes da cadeia protéica. Sabidamente, as propriedades funcionais das proteínas dependem principalmente da sua solubilidade. Para filmes de proteínas miofibrilares de peixe, as propriedades funcionais mais interessantes, como a solubilidade (essencial para formação do filme), as propriedades mecânicas (força e deformação na ruptura), a opacidade, o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água obtiveram maior desempenho a pH 3,0, onde a solubilidade da proteína apresentou valores mais altos (CUQ, 1996). O mesmo valor foi encontrado por MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL (2000).

1.2 BIOFILMES A BASE DE PROTEÍNAS

Biofilmes elaborados a base de proteínas miofibrilares mostraram características funcionais e mecânicas interessantes, fato observado por CUQ et al. (1995) que utilizaram proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico, extraídas pelo processo semelhante ao de preparação de “surimi”, que consiste na separação das miofibrilas, eliminando-se as proteínas sarcoplasmáticas e do tecido conjuntivo, realizado por sucessivas lavagens. Esses autores atribuíram esta vantagem, a que as macromoléculas de proteínas possuem em sua estrutura, até 20 monômeros diferentes (aminoácidos), com alto potencial de ligações intermoleculares multifuncionais, comparados com os polissacarídeos, que possuem cadeias de homopolímeros. No Brasil, o interesse em desenvolver embalagens a partir dessas proteínas é mais recente, e pode-se mencionar os biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo desenvolvidos por MONTERREY (1998).

1.3 PROCESSOS DE ELABORAÇÃO

A elaboração de biofilmes envolve vários componentes com finalidades específicas. De um modo geral, as formulações são constituídas pelos seguintes compostos: agente formador de filmes (macromoléculas), agente plasticizante, solvente e de ajuste de pH.

Os filmes possuem além dos componentes acima, outras substâncias que podem ser incorporadas, como agente antimicrobiano, antioxidantes, corantes e vitaminas (KROCHTA et al., 1997).

As principais macromoléculas utilizadas na formação de biofilmes são as proteínas do colágeno, do glúten, proteínas miofibrilares (carne e peixe), proteína de soja e de milho (zeína) e polissacarídeos como os alginatos, a pectina, a carragena, o amido e seu hidrolizado (dextrina) e celulose (KESTER & FENEMMA, 1986).

Os biofilmes formados a partir desses polímeros de natureza hidrofílica, geralmente exibem propriedades de barreiras ao oxigênio, dióxido de carbono, lipídeos e, sobretudo propriedades mecânicas desejáveis (KESTER & FENNEMA, 1986), mas por outro lado, são relativamente deficientes quanto à propriedade de barreira ao vapor de água (GONTARD et al., 1992). Visando reduzir este problema, têm-se realizado diversos

estudos, mediante combinações de proteínas ou polissacarídeos com lipídeos (KESTER & FENNEMA, 1986).

Os plasticizantes são substâncias de baixa volatilidade, que devem ser adicionados na solução filmogênica para conferir flexibilidade ao filme. Eles provocam uma diminuição das forças intermoleculares entre as cadeias de polímeros adjacentes, reduzindo as forças de coesão e a temperatura de transição vítrea, T_g (BANKER, 1966).

Pode-se citar alguns exemplos de agentes plasticizantes em alimentos, que são polióis, como o glicerol, sorbitol, propileno glicol, polietileno glicol e outros (BANKER, 1966). Estes plasticizantes devem ser miscíveis com as macromoléculas, e se possível, facilmente solúveis no solvente, para evitar separação prematura durante a secagem do filme (TORRES, 1994; MAHMOUD & SAVELLO, 1992).

Os solventes para filmes comestíveis ou coberturas são sensíveis a água e etanol ou à combinação dos dois (KESTER & FENNEMA, 1986). A macromolécula ao ser dispersar no solvente forma uma dispersão coloidal, termo correspondente à característica do sistema, onde as moléculas dispersas têm dimensões moleculares muito maiores do que as moléculas do solvente (XIONG, 1994). Portanto, a solubilidade das proteínas está relacionada com a capacidade de interagir com o solvente e resulta determinante no processo de produção de filmes, uma vez que a total solubilidade da proteína é necessária para o processo de formação destes. A dispersão da molécula de proteína em água é possível devido ao grande número de resíduos de aminoácidos polares e apolares, que interagem com o solvente. Essas interações podem ser melhoradas em função da constante dielétrica do solvente, uma vez que, essa constante é inversamente proporcional à força de atração intermolecular. Dessa maneira, o solvente de constante dielétrica elevada diminui a força de atração entre as moléculas e favorece essas interações (SGARBIERI, 1996).

Outro componente do filme é o agente ajustador de pH, que também influencia a solubilidade da proteína. O comportamento da proteína em função do pH está relacionado com o número de resíduos de aminoácidos de cargas positivas ou negativas, ou seja, com o caráter anfótero da proteína. O pH, onde o número de cargas é igual, corresponde à solubilidade mínima da proteína. Esse ponto é denominado ponto isoelétrico (pI). O pH

para trabalhar com proteínas deve ser acima ou abaixo do pI , onde a proteína possuirá cargas disponíveis para interagir com a água aumentando, assim, a sua solubilidade (CHEFTEL et al., 1989).

A grande maioria dos filmes comestíveis é formada a partir de soluções (KESTER & FENNEMA, 1986; SHELLHAMMER & KROCHTA, 1997), embora existam algumas pesquisas experimentais com indução do comportamento termoplástico de amido de milho (GUILBERT, 1986). KESTER & FENNEMA (1986) descreveram três técnicas abaixo descritas para a formação de filmes comestíveis a partir de soluções. Uma delas consiste na simples agregação do polímero (via evaporação do solvente, ligações cruzadas, mudança de pH, ou adição de um solvente imiscível), agregação complexa (via interação entre diferentes polímeros) e gelatinização térmica ou precipitação.

- a) Precipitação simples quando o hidrocolóide sofre uma precipitação ou uma mudança de fase que pode ser provocada pela evaporação do solvente, por adição de um eletrólito de outro solvente em que o hidrocolóide não é solúvel, por adição de um eletrólito que provoca “salting out” ou interação iônica, ou por modificação estrutural alterando o pH.
- b) Precipitação complexa quando duas soluções (ou dispersões) de hidrocolóides de cargas opostas são combinadas, provocando uma interação e precipitação do complexo de polímeros.
- c) Gelificação ou precipitação térmica quando envolve aquecimento da proteína, provocando desnaturação seguida pela gelatinização, ou precipitação, ou por simples refrigeração da suspensão de hidrocolóides aquecidos, que ocasiona a transição sol - gel.

Durante o processo de elaboração dos filmes, geralmente a proteína passa por várias etapas: (1) a ruptura das ligações intermoleculares de fraca energia que estabilizam a proteína no estado nativo, (2) o rearranjo das cadeias polipeptídicas, (3) a formação de uma rede tridimensional estabilizada por novas interações ou ligações, após eliminação do agente responsável pela ruptura das ligações intermoleculares. A ruptura inicial das ligações intermoleculares se processa de duas maneiras: pela dispersão em solvente ou por tratamento térmico em condições de fraca hidratação.

A formação de filmes a partir de proteínas miofibrilares é uma consequência da capacidade da macromolécula em formar uma rede contínua, coesa, pouco solúvel e ordenada. A rede protéica é formada de grande quantidade de ligações, proporcionadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos como pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas e forças de Van der Waals (CHEFTEL et al., 1989).

Pesquisas recentes com proteínas miofibrilares de peixe para fabricação de filmes comestíveis estão sendo realizadas por CUQ et al. (1995, 1996ab, 1997abc); CUQ, (1996); MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL (2000).

1.4 PROPRIEDADES DOS FILMES

As características físicas de filmes comestíveis são as seguintes: a espessura do filme é definida segundo as necessidades de utilização como embalagem, considerando-se a natureza, o volume e peso do alimento a ser embalado e as condições de armazenamento. Qualquer que seja a técnica de obtenção do filme é imprescindível que a sua espessura seja a mais homogênea possível. Uma não uniformidade na espessura do filme produzido pode acarretar problemas mecânicos e de conservação.

Outro parâmetro de qualidade é a textura do filme produzido, que pode ser avaliada por observação visual ou tátil. A textura do filme pode ser avaliada quanto ao aspecto de continuidade, a superfície deve ser contínua e não apresentar fraturas ou rupturas na rede, após o processo de secagem. A aparência homogênea é outro aspecto importante do filme, e não deve apresentar partículas insolúveis a olho nu, zonas de opacidade ou de cores diferenciadas e poros abertos. A transparência do filme deve ser uniforme. Quanto ao manuseio os filmes produzidos devem ser fáceis para trabalhar, manipular e ao cortar não ocorrer ruptura. A transparência dos filmes pode ser avaliada pela opacidade que influencia o potencial de aplicação dos biofilmes, uma vez que está relacionada com a aceitabilidade.

Os filmes comestíveis podem ser produzidos com diferentes características e propriedades, dependendo da formulação e do processo de fabricação. E esses aspectos serão bons ou ruins dependendo da sua utilização.

Outras propriedades de interesse na produção e utilização de filmes são as propriedades sensoriais. Os filmes devem possuir características sensoriais agradáveis ou serem o mais inertes possíveis. Por exemplo, os biofilmes não devem ter cheiro característico para não mascarar o sabor dos alimentos. O aspecto textura/táctil também é de suma importância, assim devem se obter filmes de aparência brilhante e não serem colantes.

A propriedade de barreira é uma das funções mais importantes de filmes e coberturas comestíveis, já que devem atuar como barreira ao vapor de água e aos gases (CO_2 e O_2), a solutos, óleos, gorduras e aromas. O teor de umidade em alimentos é um fator crítico, pois dele depende a manutenção da aparência viçosa do produto, o controle microbiano e da textura e consistência do produto. O conhecimento destas características funcionais é importante para se determinar as possíveis aplicações dos filmes comestíveis e biodegradáveis como embalagem.

O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água é definido como transferência do vapor permeante através de um material (KESTER & FENNEMA, 1986). A permeabilidade de gases e vapores em filmes comestíveis pode ocorrer por dois mecanismos: difusão capilar e difusão molecular. A difusão capilar é dominante em materiais porosos ou com alguma imperfeição. A difusão molecular envolve a solubilidade do gás permeante no filme, difusão através do filme e dessorção do outro lado do filme. Na ausência de imperfeições (rasgo e/ou furos) a permeação ocorre comumente por difusão molecular. Se o gás é insolúvel e ainda assim penetra no filme, o mecanismo dominante será o fluxo capilar (DONHOWE & FENNEMA, 1993).

O processo de difusão em sistema polímero/solvente depende do tamanho, natureza química, configuração e polaridade da molécula penetrante e também do movimento da cadeia do polímero na matriz do filme. Os fatores que afetam os movimentos das cadeias de polímeros incluem forças de atração entre cadeias como pontes de hidrogênio e interações tipo Van der Waals, grau de interação molecular e taxa de cristalização (KESTER & FENNEMA, 1986).

A difusão (ou migração) de um permeante (gás ou vapor) através de uma membrana não porosa, que não possui imperfeições significativas obedece à lei de difusão de Fick. A lei de Fick determina que a quantidade de permeante difundido através de uma unidade de área por unidade de tempo é proporcional ao gradiente de concentração na direção do fluxo. A constante de proporcionalidade é definida como difusividade ou coeficiente de difusão. Integrando a lei de Fick, e aplicando a lei de Henry de solubilidade e pressão, define-se o coeficiente de permeabilidade (P) como o produto da difusividade ou coeficiente de difusão (D) e o coeficiente de solubilidade (S), resultando na Equação (1.1).

$$P = D \cdot S \quad (1.1)$$

A utilização da Equação (1.1) parte do princípio que D e S são independentes da concentração do permeante. Isto é possível quando não há interação significativa entre o filme e a substância permeante. Entretanto, quando o gás ou vapor permeante interage com os constituintes do filme, ocorre um desvio da lei de Fick (BANKER et al, 1966). Esse é o caso de biofilmes formados a partir de polímeros de natureza hidrofílica, onde D e S são dependentes da pressão de vapor de água. O coeficiente de solubilidade aumenta com a pressão de vapor de água devido a sua forma, na isoterma de sorção, enquanto a constante de difusividade aumenta devido ao efeito de plasticização do filme pela absorção das moléculas de água (McHUGH & KROCHTA, 1994). Conseqüentemente, o coeficiente de permeabilidade de vapor de água através de um filme de matriz polar aumenta quando a pressão de vapor é alta. Isto tem sido atribuído a um aumento de hidratação na matriz do filme (KAMPER & FENNEMA, 1984, 1985).

O coeficiente de permeabilidade, considerando a dependência da pressão de vapor de água, experimentalmente pode ser calculado com a Equação (1.2), onde (g/t) é a quantidade de permeante que passa pelo filme de espessura x e a área (A), num determinado espaço de tempo (t) e (Δp) é a diferença de pressão parcial de vapor de água nos lados opostos do filme.

$$\text{Permeabilidade} = \frac{g}{t} \cdot \frac{x}{A \cdot (\Delta p)} \quad (1.2)$$

Na literatura encontram-se métodos clássicos de determinação do coeficiente de permeabilidade de embalagens convencionais, que podem ser usados para filmes comestíveis. Entretanto, filmes comestíveis são fortemente influenciados pelos fatores ambientais, principalmente os biofilmes a base de polímeros polares que são muito sensíveis às variações de umidade relativas (TORRES, 1994). Assim o coeficiente de permeabilidade deve ser acompanhado do valor da espessura e das condições de realização (temperatura e umidade relativa).

Estudos da transferência do vapor de água em filmes comestíveis compostos de goma arábica e de glicerol monoesterato indicaram valores do coeficiente de permeabilidade dependentes da condição de processo de elaboração (UR), e das características do filme, do permeante, bem como da formulação (MARTIN-POLO & VOILLEY, 1990).

A adição de substância tensoativa ao filme, cuja função é reduzir a característica quebradiça, e aumentar a flexibilidade do filme, possui a desvantagem de aumentar o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (GONTARD et al., 1992). Embora estas substâncias, em geral, tenham esta característica, a diminuição da resistência ao vapor de água também depende do grau de afinidade destas substâncias com a macromolécula. McHUGH et al. (1993, 1994), p.e., trabalhando com filmes de glúten de trigo, com adição dos plasticizantes glicerol e sorbitol, verificaram que o último causou uma diminuição relativamente significativa do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água, em relação a filmes similares contendo glicerol.

Outros estudos realizados por BANKER (1966), DONHOWE & FENNEMA (1993), GONTARD et al. (1992) também verificaram as alterações provocadas pela adição de plasticizante sobre as propriedades mecânicas do filme. Além deste, outros tipos de aditivos com finalidades mais específicas são encontrados em formulações de filmes comestíveis, tais como: agente antimicrobiano, vitaminas, antioxidantes, “flavors” e pigmentos.

Os filmes devem possuir propriedades mecânicas adequadas, resistência à ruptura e à abrasão, permitindo a proteção do alimento sem perder a qualidade por manuseio ou por

armazenamento. Além disso, ele deve possuir flexibilidade o suficiente para se adaptar a eventuais deformações dos alimentos sem danos mecânicos. A formulação e as condições de obtenção do filme ou cobertura comestível afetam diretamente a natureza e propriedades do filme. As propriedades mecânicas dependem da natureza química e da coesão estrutural obtida durante o processo de elaboração do filme e de outros fatores como o método de aplicação. A estrutura, sustentada por forças intermoleculares, que dá origem à rede protéica do filme, também pode ser caracterizada pela quantidade de energia necessária para romper a mesma.

As proteínas podem ter transições de fase de primeira e de segunda ordem (RÖÖS, 1995). A transição de primeira ordem mais importante é a desnaturação, caracterizada por um rearranjo espacial da molécula que se manifesta por um pico endotérmico em um termograma DSC, com uma quantidade de calor latente envolvido na mudança. A transição de segunda ordem mais conhecida é a transição vítrea (T_g), própria de materiais amorfos, que não está correlacionada ao calor latente, mas sim à mudança da mobilidade e flexibilidade molecular à temperatura crítica (BUERA & CHIRIFE, 1995). Nessa temperatura o sistema passa de um estado vítreo, caracterizado por uma alta viscosidade, rigidez e estabilidade, dada por uma baixa mobilidade molecular, onde os movimentos moleculares estão restritos a movimentos rotacionais e movimentos de extremidades de fraca amplitude, para um estado gomoso, em que a viscosidade diminui bruscamente e aumenta a mobilidade das cadeias de macromoléculas, que também apresentam movimentos translacionais (SOBRAL, 1992). Nesse ponto, as propriedades físicas dos materiais, principalmente as suas propriedades mecânicas, sofrem uma forte mudança de comportamento.

Conseqüentemente, as propriedades mecânicas de materiais amorfos são seriamente modificadas, quando a temperatura ultrapassa a T_g . A temperatura é importante pelo efeito que tem sobre os movimentos das cadeias de polímeros. Por sua vez o conteúdo de água tem um forte efeito plastificante em sistemas constituídos de polímeros, causando uma forte depressão na temperatura de transição vítrea (RÖÖS & KAREL, 1991). Logo, um incremento na umidade de um material tem o mesmo efeito de aumento de temperatura sobre a mobilidade molecular (GONTARD, 1991; SOBRAL, 1992).

A importância em determinar a temperatura de transição vítrea foi demonstrada em filmes de glúten de trigo (GONTARD et al., 1996), e de proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico (CUQ, 1996) pela análise de calorimetria diferencial de varredura e a caracterização dos filmes através de análises térmicas dinâmicas e mecânicas; confirmando sua importância como parâmetro físico-químico para o entendimento e predição do comportamento de filmes comestíveis.

1.5. APLICAÇÕES

Filmes comestíveis podem apresentar um ou mais componentes, secos ou úmidos, possuírem uma ou mais camadas. Entretanto, as características funcionais de filmes biodegradáveis comestíveis dependem do objetivo da embalagem, do teor de umidade e também do processo de deterioração a que o produto está sujeito.

Um grande número de filmes desenvolvidos possui teores de umidades bem baixos, e fabricados em forma de camada, sendo convenientes para proteger alimentos secos e de umidade intermediária. Contudo, muitos dos filmes estudados não se aplicam a produtos de altos teores de umidades (alimento com alta atividade de água, a_w , na superfície), podendo inchar, dissolver ou desintegrar ao entrar em contato com a água (GUILBERT, 1986).

Nos alimentos, um dos objetivos mais importantes dos biofilmes é a sua característica de resistência à difusão de umidade entre os diversos constituintes, isto quando a a_w deve ser mantida baixa para assegurar uma boa qualidade e aceitabilidade do produto (LABUZA & CONTRERAS-MEDELLIN, 1981).

Uma das primeiras aplicações de biofilmes e coberturas comestíveis biodegradáveis foi em frutas e vegetais frescos pós-colheita, utilizando ceras ou emulsões de cera-e-água (KESTER & FENNEMA, 1986), promovendo uma barreira de semipermeabilidade a gases e ao vapor de água.

Filmes biodegradáveis elaborados a base de macromoléculas hidrofílicas, são altamente impermeáveis a gordura e óleos. Isto é desejável quando os alimentos encobertos serão submetidos a frituras em óleo (DANIELS, 1973). Vários estudos verificaram a eficiência de hidrocolóides, polímeros de cadeias longas, que formam géis, os quais podem

ser usados em frituras para reduzir a absorção de óleo. DONHOWE & FENNEMA (1994) observaram que filmes a base de hidrocolóides podem reduzir a absorção de óleo durante a fritura. Mais recentemente (WILLIAMS & MITTAL, 1999) estudaram o uso de filmes a base de goma gelana, para diminuir a absorção de gordura em alimentos fritos como batatas congeladas, amido de milho reidratado, purê de batatas, entre outros. Tanto a perda de umidade, como a absorção de óleo foi diferente ($p = 5\%$), nas amostras cobertas por filmes, onde os valores apresentados foram sempre maiores em relação à mesma amostra não coberta.

Outro uso possível se verifica em alimentos congelados, alguns dos quais são susceptíveis as fragmentações ou desintegrações durante o manuseio, bem como para produtos frescos, onde há redução de possíveis injúrias das células da epiderme, as quais podem provocar o escurecimento do produto (KESTER & FENNEMA, 1986). Ainda com relação a alimentos congelados, frutas e vegetais quando envolvidos por filmes podem diminuir tanto os danos pelo frio como o encolhimento, o que confere uma melhor textura e aparência ao produto final (BAKER et al., 1994).

Os filmes a base de polissacarídeos possuem moderada propriedade de barreira ao oxigênio, mas são pobres com relação à permeabilidade ao vapor de água, e as propriedades mecânicas são geralmente inferiores a filmes sintéticos. P.e., JOKAY et al. (1967) desenvolveram filmes, pelo método de extrusão, de amilose e de amilose esterificada com hidroxipropileno. A grande limitação verificada nestes filmes foi a instabilidade dos filmes frente a umidade. Entretanto, estes polímeros estão sendo usados experimentalmente na formação de coberturas comestíveis em alimentos, como barreiras físico-químicas ao oxigênio e lipídeos, e para melhorar a aparência, textura e manuseio.

Coberturas fabricadas a partir de polissacarídeos foram usadas para melhorar a qualidade de carnes armazenadas, incluindo alginatos, carragena, pectina e derivados de amido. Muitas destas coberturas oferecem pouca barreira a umidade. Entretanto, a cobertura serve como um meio de retardar a perda de umidade do produto (KESTER & FENNEMA, 1986; STUCHEL & KROCHTA, 1995).

Derivados de celulose, geralmente combinados a um plasticizante como o óleo, têm sido utilizados para envolver carnes frescas e congeladas (DANIELS, 1973).

Uma outra variação tecnológica de cobertura comestível é a “yuba”, a base de proteínas de soja, um alimento tradicional oriental. Ele é produzido como uma fina camada de proteína de soja desnaturada numa superfície aquecida de leite de soja (WU & BATES, 1973). Este filme é usado como cobertura em carnes ou vegetais, ou como ingrediente para sopas (WU & BATES, 1975).

A gelatina obtida pela clivagem hidrolítica das cadeias de colágeno, também é capaz de produzir biofilmes de razoáveis propriedades mecânicas, entretanto, apresenta fraca resistência à permeabilidade ao vapor de água (CARVALHO, 1997). A gelatina tem sido mais utilizada na fabricação de coberturas comestíveis, como barreira à migração de oxigênio, umidade e óleo, ou ainda como meio de fixação de agentes antioxidantes ou antimicrobiano. A gelatina, também é usada como encapsulador de ingredientes, com baixo teor de umidade ou em fase óleo, na indústria farmacêutica (KROCHTA & MULDER-JOHNSTON, 1997).

O processo de microencapsulação é uma aplicação de filmes biodegradáveis, na qual combina-se a função de facilitar a separação dos ingredientes (com diferente atividade de água), evitando a difusão de umidade, a mistura de “flavors”, cor, vitaminas, acidulantes, temperos, entre outros (GIESE, 1993).

2. BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, L.; NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; MCGILL, J.N. I. Development and Physical Testing of a Starch-Algin Coating. **Food Technology**, v.17, p.1437-1441, 1963.
- AVENA-BUSTILLOS, R.J.; KROCHTA, J.M.; SALTVEIT, M.E. Water vapor resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride films. **Journal of Food Science**. v.62, n.2, p.351-354, mar./abr. 1997.
- BANERJEE, R.; CHEN, H. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**. v.78, n.8, p.1673-1683, ago. 1995.
- BANKER, G.S. Film coating theory and practice. **Journal Pharmaceutical**. v.55, p.81-89, 1966.
- BAKER, C.S.; BALDWUIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O. Edible coatings and films for processed foods. In: **Edible coatings and films to improve food quality**. Ed. J.M. KROCHTA; E.A. BALDWUIN; M.O. NISPEROS-CARRIEDO. p.89-104. Lancaster: Technomic Publishing Company, New York, 1994.
- BUERA, M.P; CHIRIFE, J. Interacciones agua-proteína: Transición vítrea y aplicaciones potenciales. **Boletim SBCTA**. v.29, n.2, p.107-113, jul./dez. 1995.
- CARVALHO, R.M. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. Campinas (SP): UNICAMP, 1997. 128p. Dissertação de mestrado.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, Modificaciones**. Zaragoza: Acribia, 1989. p.346.
- CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol. **Cereal Chemistry**. v.72, n.1, p.1-6, 1995.
- CHINNAN, M.S.; PARK, H.J. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. **Journal of Food Process Engineering**. v.18, n.4, p.417-429, 1995.
- CUQ, B. **Mise en forme et caractérisation de biomatériaux à base de protéines myofibrillaires**. Montpellier: Université Montpellier II, 1996. 213p. (Tese, Doutorado em Biochimie et technologies Alimentaires).

- CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**. v.60, n.6, p.1369-1374, nov./dez. 1995.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Rheological model for the mechanical properties of myofibrillar protein-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.44, n.4, p.1116-1122, abr. 1996a.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**. v.61, n.3, p.580-584, maio/jun. 1996b.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.45, n.3, p.622-626, 1997a.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermoplastic properties of fish myofibrillar protein: application to biopackaging fabrication. **Polymer**. v.38, n.10, p.2399-2405, 1997b.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by moisture content. **Polymer**. v.38, n.16, p.4071-4078, 1997c.
- DANIELS, R. **Edible coatings and soluble packaging**. New Jersey: Noyes, 1973. p.346.
- DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Water vapor and oxygen permeability of wax films. **Journal of American Oil Chemistry Societies**. v.70, n.9, p.867-872, set. 1993.
- GNANASAMBANDAM, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; COLEMAN, M. Mechanical and barrier properties of rice bran films. **Journal of Food Science**. v.62, n.2, p.395-398, mar./abr. 1997.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Moisture adsorption by grain protein films. **Transactions of the ASAE**. v.37, n.2, p.535-539, 1994.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; TESTIN, R.F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**. v.70, n.4, p.426-429, jul./ago. 1993.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; GOODING, C.H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. **Journal of Food Engineering**. v.21, n.3, p.395-409, abr. 1994.
- GENNADIOS, A. WELLER, C.L. ; HANA, M.A.; FROMING, G.W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, v.61, n.3, p.585-589, 1996.

- GIESE, J. Packaging, storage and delivery of ingredients. **Food technology**. v.47, n.8, p.54-62, ago. 1993.
- GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. Montpellier, 1991. 174p. Tese (Doutor en Sciences des Aliments) - Université Montpellier II, Académie de Montpellier.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. In: **Food packaging and preservation**. Mathouthi, M. ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1994, p.159-181.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**. v.57, n.1, p.190-199, jan./fev. 1992.
- GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. **Journal Agricultural of Food Chemistry**. v.44, n.11, p.3474-3478. nov. 1996.
- GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: Mathlouthi M. ed. **Food packaging and preservation**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p.371-395.
- GUILBERT, S.; BIQUET, B. Les films et enrobages comestibles. In: **L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation**. BUREAU, G. e MULTON, J.J. ed. Technique et Documentation, Lavoisier, Apria, Paris, p.320-359, 1989.
- JOKAY, L.; NELSON, G.E.; POWELL, E.L. Development edible bilayer amylaceous coatings for foods. **Food Technology**. v.21, p.1064, 1967.
- KAMPER, S.L.; FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible bilayer films. **Journal of Food Science**. v.49, p.1478-1481, 1984.
- KAMPER, S.L.; FENNEMA, O. Use of an edible film to maintain water vapor gradients in foods. **Journal of Food Science**. v.50, n.2, p.382-384, mar./abr. 1985.
- KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**. v.40, n.12, p.47-59, dez. 1986.
- KROCHTA, J.M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**. v.51, n.2, p.60-74, fev., 1997.
- LABUZA, T.P.; CONTRERAS-MEDELLIN, R. Prediction of moisture protection requirements for foods. **Cereal Foods Word**. v.2, p.335, 1981.

- MAHMMOUD, R.; SAVELLO, P.A. Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. **Journal Dairy Science**. v.75, n.4, p.942-946, abr. 1992.
- MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A. Comparative study of the water permeability of edible film composed of arabic gum and of glycerolmonostearate. **Sciences des Aliments**. v.10, n.2, p.473-483, jun. 1990.
- McHUGH, T.H.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; 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, jul./ago. 1993.
- McHUGH, T. H.; KROCHTA, J.M. Sorbitol- vs glicerol-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, abr. 1994.
- MENEGALLI, F.C.M.; SOBRAL, P.J.; ROQUES, M.A. Characteristics of gelatin biofilms in relation to drying process conditions. **In: Drying '98 – Proceedings of the 11th International Drying Symposium (IDS '98)**, aug., Halkidiki, Greece, 1998, vol.C, p.1704-1712.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S. **Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes**. Pirassununga: Universidade de São Paulo-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. 1998. 83p. Dissertação de Mestrado.
- MONTERREY-Q, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.179-190, 2000.
- MONTERREY-Q, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Isotermas de sorção de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo a 15, 25 e 35 °C. **In: Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, RJ, 1998. Submetido a publicação.
- OKAMOTO, S. Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**. v.23, n.5, p.257-262, maio. 1978.
- PARK, J.H.; WELLER, C.L.; VERGANO, P.J.; TESTIN, R.F. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. **Journal of Food Science**. v.58, n.6, nov./dez. 1993.
- RÖÖS, Y.; KAREL, M. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. **Journal of Food Science**. v.56, n.1, p.38-43, jan./fev. 1991.
- RÖÖS, Y. **Phase transitions in food**. Academic Press, San Diego, 360 p, 1995.

- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações.** São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.
- SHELLHAMMER, T.H.; KROCHTA, J.M. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. **Journal of Food Science.** v.62, n.2, p.390-394, mar./abr. 1997.
- SOBRAL, P.J.A. **Diffusivité de l'eau dans le gel polyacrylamide-eau autour de la transition vitreuse.** Tese Doutorado, INPL, Nancy, 1992, França.
- STUCHELL, Y.M.; KROCHTA, J.M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. **Journal of Food Science.** v.59, n.6, p.1332-1337, nov./dez. 1994.
- TORRES, J.A. Edible films and coatings from proteins. In: HETTIARACHCHY, N.S., ZIEGLER, G.R. (Eds.). **Protein functionality in food systems.** New York: Marcel Dekker, Inc., p.467-507, 1994.
- WILLIAMS, G.; MITTAL, G.S. Low-fat fried foods with edible coatings: Modeling and simulation. **Journal of Food Science.** v.64, n.2, p.317-322, mar./abr., 1999.
- WU, L.C.; BATES, R.P. Influence of ingredients upon edible protein-lipid film characteristics. **Journal of Food Science.** v.38, n.5, p.783-787, jul./ago. 1973.
- WU, L.C.; BATES, R.P. Protein-lipid films as meat substitutes. **Journal of Food Science.** v.40, n.1, p.160-163, jan./fev. 1975.
- VOJDANI, F.; TORRES, J.A. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose coating: Effect of affect of fatty acids. **Journal of Food Science.** v.55, n.3, p.841-846, 1990.
- XIONG, Y.L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition.** v.34, n.3, p.293-320, maio. 1994.

CAPÍTULO 2

PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

1. INTRODUÇÃO

Existe uma variedade de compostos que tem a capacidade de formar filmes. Dentre esses se destacam as proteínas, que são caracterizadas por possuírem uma estrutura específica, constituída de 20 monômeros diferentes. A estrutura característica é determinada pela composição, seqüência de aminoácidos e a relação das cadeias laterais polares e não polares que formam os diferentes tipos de interações na molécula. A conformação da estrutura de proteína pode mudar devido ao caráter anfótero da macromolécula, que possui cargas negativas ou positivas, em valores acima ou abaixo do ponto isoelétrico (pI). O pI é definido como o pH no qual a soma das cargas negativa e positiva ao longo das cadeias laterais da proteína é zero. No caso de proteínas essas cargas favorecem interações com a água formando múltiplas ligações em diferentes posições, de natureza e energia diversas, conferindo maior potencial às propriedades funcionais (CUQ, 1996).

A funcionalidade das proteínas é definida como qualquer propriedade físico-química que pode ser a expressão de uma ou mais propriedades, e modificar-se em função de diferentes condições de tratamento (pH, temperatura, aditivos) e de suas interações. As propriedades funcionais das proteínas dependem do potencial dessas ligações cruzadas intra e intermoleculares que são também interessantes para a formação de biofilmes (CUQ et al., 1995).

1.1 PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

As proteínas localizadas no interior da membrana sarcolema são aquelas classificadas como intracelulares. Uma outra classificação das proteínas está baseada na distribuição no músculo, na organização, na solubilidade, e nas suas funções no músculo. São subclassificadas em grupos: (1) as proteínas estromáticas, (2) as proteínas sarcoplasmáticas e (3) as proteínas miofibrilares (SGARBIERI, 1996).

As proteínas sarcoplasmáticas, solúveis em água e baixas concentrações de sais constituem aproximadamente 30-35% da proteína total do músculo ou 5% do peso total,

Tabela (2.1). As proteínas estromáticas colágeno e elastina, localizadas nos espaços intersticiais das células dos músculos, que coletivamente são denominadas de tecidos conectivos, pois também fazem parte as mucoproteínas globulares, componentes não protéicos assim como lipídeos e diferentes mucopolissacarídeos. Estas proteínas são insolúveis em solventes aquosos, representando 10-15% de toda proteína do músculo. Duas proteínas do tecido conectivo, colágeno e elastina, representam a maior parte da fração protéica estromática, embora as proporções exatas de colágeno e elastina variem bastante, na mesma espécie animal.

Tabela 2.1 - Proteínas do músculo.

Tipo Proteína	Proteína músculo %	Principal constituinte	Propriedades
estromática	15 – 20	colágeno, elastina	insolúvel, extracelular, tecido conjuntivo
sarcoplasmática	30 – 35	mioglobina	solúvel, intracelular, ativa biologicamente
miofibrilares	50 – 55	miosina, actina, tropomiosina, troponina	ligeiramente solúvel, intracelular e contráteis

Fonte: ALAIS & LINDEN (1991).

As proteínas miofibrilares são compostas de miofibrilas (1-2 μm de diâmetro), delgadas. Elas constituem cerca de 55-60% do total da proteína do músculo, incluindo as proteínas contráteis (actina e miosina) e proteínas reguladoras da contração muscular (tropomiosina, troponina, α e β actinina, proteína M, proteína C). As proteínas miofibrilares com suas características estruturais aparecem na Tabela (2.2).

A miosina na forma de bastão alongado é a mais abundante, representando 55% da miofibrila. Possui em uma extremidade, duas regiões globulares formando a chamada cabeça da miosina, onde se localizam os sítios de ligações com actina e ATP. As moléculas de miosina associam-se umas às outras na região da cauda, para formar o miofilamento, que contém 200-400 moléculas de miosina.

A molécula miosina é constituída de duas cadeias polipeptídicas, chamadas cadeias pesadas, de peso molecular próximo a 200.000 Da. Essas cadeias apresentam uma estrutura de dupla α -hélice, e pI de 5,4. Na extremidade globular da molécula de miosina estão localizadas as cadeias leves, com pesos moleculares variando de 16.000 a 27.000 Da.

Tabela 2.2 - Principais características das proteínas miofibrilares do músculo.

	g/100 g de proteína	Peso molecular (Da)	Subunidades
Proteínas miofibrilares	50 - 55		
Miosina	27	475.000	2
Actina	11	41.785	1
Tropomiosina	4,3	70.000	1
Troponina	4,3	72.000	1
Troponina T		30.500	1
Troponina I		20.685	
Troponina C		17.845	
Proteína M	2,2	160.000	1
Proteína C	1,1	140.000	1
α -actinina	1,1	206.000	2
β -actinina	0,5	70.000	

Fonte: CHEFTEL et al. (1989).

A actina é uma proteína importante do filamento delgado, representando 20% da miofibrila. Apresenta-se em duas formas: uma globular, a actina-G, cujo peso molecular é de 42.000 Da e a outra forma fibrosa, actina-F, originada da polimerização da actina-G, em filamento dupla hélice (com 13 monômeros por giro), contendo em cada filamento, 300-400 resíduos de aminoácidos. O termo actomiosina é um complexo de miosina, actina-F, actina-G, tropomiosina, troponina e actinina (ZIEGLER & ACTON, 1984).

Outras proteínas como as tropomiosinas, as troponinas e a α -actinina estão localizadas sobre a hélice da actina-F. A tropomiosina representa 4-6% das proteínas miofibrilares, tem a forma de bastonetes e estrutura α -hélice. É composta de duas subunidades (α e β) que se entrelaçam formando uma dupla hélice, cada uma com peso molecular próximo a 34.000 Da. Existem três classes de troponina: a troponina T, I, C de pesos moleculares da ordem de (30.500, 21.000 e 18.000 Da), respectivamente. As

proteínas reguladoras têm um papel importante na contração muscular. A tropomiosina juntamente com a troponina regula o nível de cálcio que participa do processo de interação da actina com a miosina.

Estudos realizados com proteínas miofibrilares têm revelado seu importante papel nas propriedades de gelatinização (ASGHAR et al., 1985; SAMEJIMA, 1984; YATES et al., 1983). A desnaturação é geralmente induzida pela ação do calor (ISHIOROSHI et al., 1979) e a transformação do estado sol em gel resulta na formação de uma rede tridimensional resultante de interações entre as moléculas de proteínas (SAMEJIMA et al., 1969; ISHIOROSHI et al., 1979). O mecanismo de formação do gel depende da quantidade de proteína, predominantemente, e do tipo de interação que estabiliza o gel (SCHIMIDT et al., 1981) e da temperatura que o gel é formado. Os tipos e forças dessas interações no gel é que influenciam na resposta à tensão, assim como agitação mecânica ou mudança de temperatura durante o processo de formação do gel (PAUL & PALMER, 1972).

No estudo da gelatinização de proteínas miofibrilares de diferentes espécies de músculos (de porco, de carne, de peixe, peito e coxa de frango e peru), nas concentrações de 5, 7, 10 e 20% de NaCl, utilizando indução térmica, LAN et al. (1995) verificaram que as propriedades de gelatinização dos diferentes tipos de miofibrilas se alteraram com a concentração de proteína. Isto sugere que a quantidade de interações entre moléculas de proteínas na matriz de gel de alta concentração pode diferir daquelas ocorridas em suspensão de proteínas diluídas.

No estudo da formação de géis a partir de três frações protéicas do músculo de peixe, SADOWSKA & SIKORSKI (1976) verificaram que a fração sarcoplasmática (albumina) não possuía a capacidade de gelatinização. Similares resultados foram encontrados para fração de proteína estromática. Entretanto, a fração miofibrilar exibiu excelente habilidade de formar géis, mas ao submeter-se a lavagem exaustiva formou géis fracos. A força do gel diminuiu possivelmente devido à perda de alguns componentes protéicos menores presentes na preparação inicial da proteína miofibrilar.

As propriedades funcionais das proteínas miofibrilares, miosina no músculo *pré-rigor*

e actomiosina no *post-rigor* são essenciais no processo de gelificação quando ocorre a etapa de dissociação-solubilização. Em geral esta etapa realiza-se por adição de sais (cloreto e fosfato de sódio). A miosina facilmente se solubiliza na presença de sais, pois grande parte dos aminoácidos que constituem a macromolécula possui caráter hidrofílico e, aproximadamente, 80% são aminoácidos que possuem grupos ácidos e básicos expostos na superfície (CHEFTEL et al., 1989). Os íons cloreto e sódio em contato com água são hidratados e fortemente atraídos pelos grupos ácidos e básicos dos aminoácidos carregados positivamente, provocando um aumento de grupos negativamente carregados e a repulsão entre esses grupos favorece a abertura da cadeia de proteína, expondo um número maior de grupos negativos, que tem mais afinidade com a água, aumentando assim sua solubilidade. As ligações iônicas intermoleculares em sua maioria são quebradas, desintegrando parcialmente a estrutura secundária da molécula de proteína. Portanto, a estrutura resultante da macromolécula está diretamente relacionada ao processo de extração.

A extratibilidade das proteínas pode também ser influenciada por outros fatores como vigor de mistura, tempo de tratamento, velocidade de centrifugação, temperatura, animal e músculo selecionado, e pelas condições de armazenamento até o momento da extração (REGENSTEIN & STAMM, 1979). DECKER et al. (1993) verificaram o efeito da oxidação de proteínas miofibrilares de músculo de peru, e observaram a perda de miosina e actina com concomitante formação de polímeros de proteínas. Estes resultados mostraram claramente que a funcionalidade de proteína decresce e pode estar relacionada a mudanças físicas e químicas das proteínas oxidadas. As possíveis mudanças das proteínas que resultam em danos à estrutura destas e destruição de certos aminoácidos são decorrência do processo de extração envolver cominuição, homogeneização e sucessivas lavagens, que provocam o contato com o oxigênio.

Cominuição é definida como o processo de redução de matérias-primas a um estado particularmente fino, no qual se rompe fisicamente o tecido muscular, membranas e o sarcolema com objetivo de liberar miofibrilas e miofilamentos, com conseqüente extração das proteínas miofibrilares, quando realizada à elevada força iônica (0,6 M ou superior) (SMITH, 1988). Neste processo ocorre entumescimento das fibras musculares,

despolimerização com solubilização da miosina e/ou actomiosina e, uma vez que os sítios de ligação das proteínas miofibrilares estão expostos à solução salina ao invés de estarem restritas apenas às interações proteínas-proteínas, a capacidade de interação de água é aumentada, bem como a viscosidade do sistema.

Durante a cominuição, a gordura é reduzida a glóbulos e o tecido conectivo converte-se em partículas ou fragmentos (WHITING, 1988). O aumento da viscosidade na matriz proteica contínua, causada pelo entumescimento da fibra muscular na presença de soluções salinas, estabiliza a gordura na fase dispersa. Isto ocorre devido ao lento desenvolvimento da adsorção da camada de proteínas miofibrilares, restringindo a coalescência dos glóbulos de gordura (ASGHAR et al., 1985). Durante a extração das proteínas através do efeito “salting-in” do cloreto de sódio e desintegração do tecido muscular, ocorre um aumento na capacidade de ligação de água e proteínas miofibrilares. Quanto mais próximo do ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares, menor é a capacidade de ligação de água (ACTON et al., 1981). Adição de NaCl produz um deslocamento do pI das proteínas para valores mais baixos criando uma maior carga líquida negativa em relação ao pH existente dos grupos carboxilas ionizáveis da proteína. A repulsão entre estes grupos negativamente carregados leva à abertura das moléculas de proteínas e a um aumento na hidratação (HAMM & DEATHERAGE, 1960). Íons cloretos hidratados são fortemente atraídos pelos grupos carregados da proteína rompendo assim as pontes inter e intramoleculares, resultando num aumento adicional de carga negativa e, por sua vez, maior atração e ligação com a água (LUMRY, 1973). A capacidade de ligação e/ou retenção de água são diretamente influenciadas pelo grau de extração de proteínas, tratamento mecânico, ambiente iônico e pH.

A **solubilidade** das proteínas em sistemas aquosos é um pré-requisito para a maioria das propriedades funcionais. Muitas das propriedades funcionais das proteínas, incluindo a habilidade em formar géis, dependem de sua solubilidade. A solubilidade pode ser definida como a porcentagem da proteína total do músculo na solução, sob condições específicas e que não é sedimentada por força centrífuga moderada (XIONG, 1994). A nível molecular, McHUGH & KROCHTA (1994) definem a solubilidade, como resultante de uma força de

atração maior entre o solvente e a molécula do que entre elas mesmas. A solubilidade é uma propriedade físico-química, que depende de vários fatores como o peso molecular e conformação da molécula, densidade e distribuição das cargas elétricas, que por sua vez é influenciada pelo pH, natureza e concentração de íons ou força iônica, constante dielétrica do solvente e a temperatura. Deve-se ressaltar que o tipo de solvente também interfere na solubilidade da proteína, tendo em vista que a força (F) efetiva de atração entre as partículas depende da constante dielétrica do solvente, que é dada pela Equação (2.1).

$$F = z_1^+ \cdot z_2^- / D_s \cdot r^2 \quad (2.1)$$

Onde: z_1 e z_2 são cargas antagônicas, D_s é a constante dielétrica do solvente, r é a distância entre as cargas z_1 e z_2 . Segundo a Equação (2.1), quanto maior for a constante dielétrica do solvente menor será a força de atração entre as cargas, e maior será a solubilidade. A água, por ser um solvente orgânico de alta constante dielétrica é considerada um bom solvente para a maioria das proteínas. Outro fator importante é a temperatura: a maioria das proteínas é solúvel à temperatura ambiente e a solubilidade tende a aumentar à medida que a temperatura se eleva de 40 a 50 °C (SGARBIERI, 1996).

A variação de pH é outro fator que modifica a ionização e a carga líquida da proteína, alterando as forças de atração e repulsão entre as proteínas e da associação com a água (BORDERIAS & MONTERO, 1988). As proteínas são mais solúveis em pH baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos) por apresentarem excesso de cargas positivas ou negativas, respectivamente. O pH de menor solubilidade é o ponto isoelétrico (pI). O pI das proteínas miofibrilares está próximo a 4,5 (CHEFTEL et al., 1989). A solubilidade da proteína é de grande importância na escolha de métodos de fracionamento e depende da proporção de grupos hidrófobos e hidrófilos na molécula. À medida que as moléculas protéicas aumentam de tamanho, diminui a relação dos grupos hidrofílicos/hidrofóbicos e conseqüentemente a solubilidade. O aumento do volume aumenta ligeiramente a possibilidade de grupos polares situarem-se na superfície.

O objetivo deste trabalho foi obter um método de extração, adequado às condições de trabalho, bem como a caracterização de proteínas miofibrilares do músculo

Semitendinosus bovino. A caracterização química objetivou dosar o teor de proteína, a fração de lipídeos, o teor de cloretos, de cinzas e de umidade da amostra; a caracterização física caracterizou o tamanho do grânulo; e a caracterização biológica identificou as frações protéicas através da eletroforese, por troca iônica, e composição em aminoácidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Utilizou-se o músculo *Semitendinosus*, adquirido no comércio local. Após remoção da gordura externa e do tecido conjuntivo visível, a redução de peso foi de 47 % do peso inicial. O músculo foi cortado no sentido transversal das fibras, em pedaços de peso variando de 100 a 150 g e embalados em filmes de PVC, para evitar desidratação. O baixo peso da amostra foi uma restrição, devido ao tipo de extração utilizada. A extração diferencial em diferentes concentrações de soluções salinas é inviável para grandes quantidades de amostras devido à capacidade da centrífuga. As amostras foram, em seguida, armazenadas a temperatura de -20 °C. Todas as amostras foram utilizadas no prazo de 3 meses.

As proteínas miofibrilares foram extraídas do músculo no estado *pós-rigor mortis*, seguindo-se o método modificado de EISELE & BREKKE (1981) e adaptado às condições de trabalho do laboratório, cujo esquema está apresentado na Figura (2.1). Todas as etapas de preparação foram realizadas na faixa de temperatura de 2 a 4 °C. Por isso todas as soluções tampões utilizadas foram previamente refrigeradas. As amostras foram descongeladas durante uma noite, a 4 °C, e cortadas em forma de cubos de aproximadamente 2 cm de aresta. Em seguida, o músculo foi passado por um moedor de carne (Filizola, São Paulo, Brasil). Ao músculo moído foram adicionados 6 vezes seu peso, de solução tampão fosfato de sódio 0,05M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7,0 e cloreto de sódio (NaCl) 0,1M. A seguir o material foi misturado em um liquidificador por 90 segundos e

posteriormente, em um homogeneizador (Fisaton, São Paulo, Brasil), para quebrar células e fibras do músculo durante 2 horas. O homogeneizado foi em seguida, peneirado, para eliminar o excesso de tecido conjuntivo, em sua maioria proteínas estromáticas. Seguiu-se a centrifugação da suspensão numa centrífuga sob refrigeração (Modelo Sorval RC2 - B) utilizando o rotor tipo GSA, e uma velocidade rotacional de 6000 rpm/20 min.

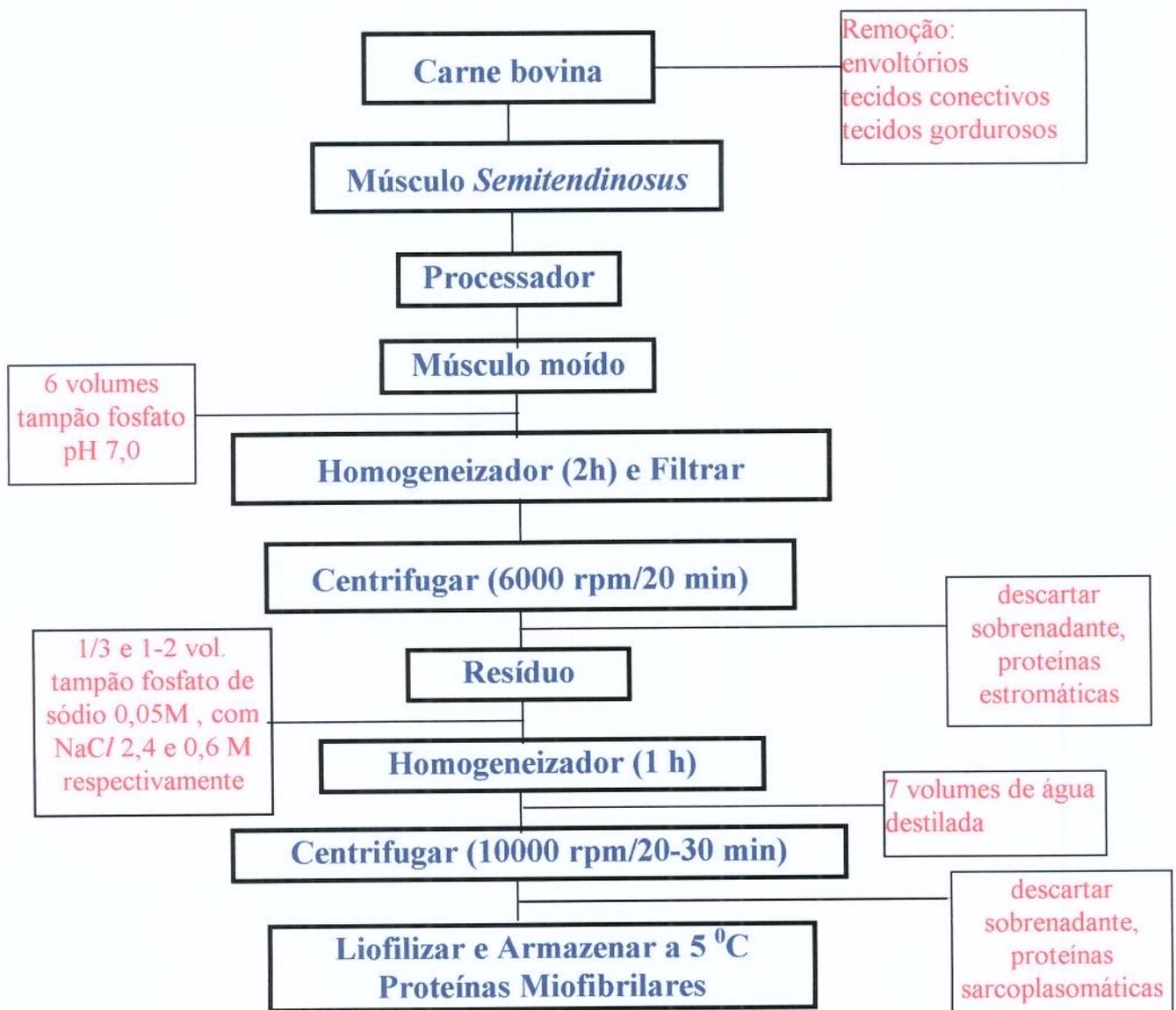


Figura 2.1 - Fluxograma de extração de proteínas miofibrilares bovina EISELE & BREEKE (1981), adaptado.

O sobrenadante, constituído de proteínas sarcoplasmáticas, foi descartado. Seguindo o processo de reextração, adicionou-se ao decantado, 1/3 de seu peso, de solução tampão fosfato de sódio 0,05M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7,0 e cloreto de sódio (NaCl) 2,4M, sob agitação, para dispersar o resíduo. Adicionou, então, 1 a 2 vezes, o peso do resíduo inicial de solução tampão fosfato de sódio 0,05M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7,0 e cloreto de sódio (NaCl) 0,6M, mantendo-se o tempo de 1 hora para extração. Após adicionou-se a esta mistura, 7 vezes, seu peso, de água destilada refrigerada, sob agitação, seguida de centrifugação a 10.000 rpm/20-30 min. Descartou-se o sobrenadante, constituído de proteínas em sua maioria sarcoplasmáticas. Na seqüência, os resíduos, constituídos de proteínas miofibrilares, foram liofilizados, visando obter um lote homogêneo suficiente para análises futuras. O liofilizador utilizado (Modelo FD3, Heto-Holten, Virtis, New York), operou com a temperatura da câmara variando de 25 a -40°C .

As proteínas miofibrilares liofilizadas foram acondicionadas em potes de polietileno, sob sílica gel, armazenado a temperatura de 5°C , até a obtenção de um grande lote homogêneo, utilizado em todos os experimentos.

2.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DAS PROTEÍNAS

O teor de proteínas do material liofilizado foi analisado pelo método semi-micro (N x 6,25) Kjeldhal (A.O.A.C. 1980). Os lipídeos foram determinados segundo o método de BLIGH & DYER (1959). O teor de sais foi determinado segundo o método NEVES (1998). O teor de cinzas foi determinado pelo método de incineração em mufla (Quimis, Brasil) a 450°C , segundo o método A.O.A.C. (1980). As umidades das amostras foram determinadas em estufa (Modelo 315-SE, FANEM, Brasil) a $100^\circ\text{C}/24$ h. A proteína liofilizada foi triturada num moinho de facas Marcon (Modelo TE 345, Piracicaba, SP), por 2 min. A granulometria das proteínas foi determinada, passando por um tamis de abertura de 0,125 mm (Telastem, Granutest, Brasil).

2.3 AMINOGRAMA

Para determinação do teor de aminoácidos nas proteínas miofibrilares, empregou-se

o método que consiste na hidrólise da proteína em meio ácido (HCl 6,0 N), a 110 °C/22 h. Em seguida a solução foi passada por um filtro de placa porosa. O ácido clorídrico foi eliminado, colocando-se a solução em evaporador rotatório a 50 - 60 °C, a vácuo. Após esta etapa, a recuperação dos aminoácidos, na forma livre, foi realizada agregando-se um tampão citrato de pH 2,2. Aliquotas de 25 µl dos aminoácidos na forma protonada foram introduzidas na coluna de troca iônica Dionex DX 300. As cargas positivas dos aminoácidos deslocam os íons sódicos ficando os aminoácidos fixos à resina pelos grupos amínicos protonados ($-N^+H_3$). Os aminoácidos mais básicos são absorvidos mais fortemente pelas cargas negativas da resina, sendo eluídos à medida que o pH dos tampões eluentes aumenta, nesta ordem: tampão citrato de sódio 2% e cloreto de hidrogênio 0,6%, A, pH 3,15; tampão cloreto 5% e acetato 1,4% de sódio, B, pH 7,4; regenerante, C, hidróxido 0,6% e cloreto 0,4% de sódio (Pickering Laboratories Inc, USA). São eluídos inicialmente os aminoácidos dicarboxílicos (ácidos) e neutros, e por último os de natureza básica. Ao sair da coluna os aminoácidos reagem com ninidrina. O produto dessa reação é quantificado num colorímetro. As áreas dos picos obtidos a partir das amostras desconhecidas são quantificadas e comparadas à de uma mistura padrão de aminoácidos.

2.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas miofibrilares liofilizadas de músculo *Semitendinosus* bovino foi determinada de acordo com o procedimento de LAEMMLI (1970). No preparo da amostra de proteína de concentração foi utilizada, 4,7 mg/ml de solução de β -mercaptoetanol; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol; SDS 10% p/v; azul de bromofenol 0,1% p/v dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e a desnaturação ocorreu a 95 °C/5 min. A técnica empregada foi gel poliacrilamida (SDS-PAGE) com gradiente de separação, 5 a 20%, e gel de empilhamento de 4% (acrilamida, Tris-HCl pH de 8,8, água e TEMED), imerso em solução tampão Tris 0,025 M; glicina 0,192; SDS 0,1% pH 8,3. Utilizou-se o padrão BIO-RAD contendo as seguintes proteínas: 1- Miosina (200.000 Da); 2- β -galactosidase (116.250 Da); 3- Fosforilase B (97.400 Da); 4- Soro albumina (66.200 Da); 5- Ovo albumina (45.000 Da); 6- Anidrase carbônica (31.000 Da); 7- Inibidor tripsina (21.500 Da); 8- Lisozima (14.400 Da). As bandas foram reveladas

com o corante Coomassie-G-250. As determinações das faixas de pesos moleculares das proteínas miofibrilares foram efetuadas empregando-se o método de densitometria dos géis, realizada em densitômetro Sharp JX330, utilizando-se “software” Image Master 1 D (Pharmacia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas miofibrilares liofilizadas resultante do processo de extração de músculo *Semitendinosus* bovino, *pós-rigor mortis*, apresentaram-se na forma de pó branco (Figura 2.2). A fração de proteína miofibrilar foi definida em termos da solução de extração. A miosina é solúvel em água e a actimiosina somente incha na presença deste solvente. Com base nesta tese e subseqüente estudos, é comum a prática original da extração das proteínas do músculo pelo uso de solução tampão 0,6 M KCl para solubilizar a maioria das proteínas (STANLEY et al., 1994).



Figura 2.2 - Proteínas miofibrilares liofilizadas extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, *pós-rigor mortis*, armazenada a 5 °C.

Embora o processo de extração diferencial apresente um fator limitante, por ser realizado em partes, este permite a separação, protegendo a proteína de possíveis injúrias e degradação durante o processo de extração (WHITAKER, 1973). Para contornar esta limitação, foram realizadas consecutivas extrações, para formar um único lote de aproximadamente 760 g de amostra para todos os testes. Os lotes de amostras foram devidamente misturados para formar uma mistura homogênea e posteriormente moída, e passados em peneira de abertura de 0,125 mm (Telastem, Granutest, Brasil), o equivalente a 100 mesh.

3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS PROTEÍNAS

As proteínas miofibrilares liofilizadas extraídas do músculo *Semitendinosus* bovino, apresentaram um teor médio de proteína de 84,26%, e de umidade 3,02%. Esse resultado de porcentagem de proteína é superior aos resultados apresentados por STANLEY et al. (1994) de análises de proteínas miofibrilares extraídas, com solução de força iônica (30 mM) utilizando a centrifugação, de músculo *peitoral* de frango (70,2%) e músculo bovino *Semimembranosus* (67,9%), ambas as análises foram realizadas seis dias *pós rigor mortis*. Outro resultado também inferior foi observado por OCUNO & SOBRAL (1998) de proteínas miofibrilares (82,5%) de origem bovina no estado *pós rigor mortis*, extraídas de paleta de forma análoga ao preparo de surimi. Uma provável causa da menor quantidade extraída de proteínas deve-se a metodologia empregada, onde as proteínas solúveis, principalmente, e insolúveis podem ser levadas pela água das sucessivas lavagens. Calculou-se o rendimento aproximado de 46%, considerando a fração de proteínas miofibrilares no músculo de 50 a 60% (CHEFTEL et al., 1989). O teor de gordura apresentado de 4,9% foi duas vezes inferior ao resultado de OCUNO & SOBRAL (1998). A quantidade de gordura inferior deve-se ao tipo de extração utilizada, embora a carne possua um alto teor de gordura. Também é característico o alto teor de proteínas contráteis. A presença de 0,15% (ou 0,088 moles/100 g de proteína) de sal na proteína miofibrilar é resultado do resíduo de cloreto de sódio utilizado no processo de extração. Outro fato concomitante observado foi o elevado teor de cinzas, 7,42%, que evidencia a grande quantidade de minerais na amostra, de fonte externa (solução tampão, cloreto de sódio) e interna de minerais.

3.2 ELETROFORESE

O resultado da eletroforese em SDS-PAGE poliacrilamida das proteínas miofibrilar é visto na Figura (2.3-2), ao lado do perfil eletroforético de pesos moleculares padrões estimados Figura (2.3-1). Os resultados da densitometria estão na Figura (2.4). A eletroforese em gel apresentou resultados comparáveis aos observados em proteínas miofibrilares de frango por SAMEJIMA & WOLFE (1976) e STANLEY et al. (1994) e de carne bovina por YATES et al. (1983) e KENNEY et al. (1992).

De acordo com os pesos moleculares estimados (Tabela 2.3), a banda (a), mais intensa da proteína miofibrilar liofilizada corresponde à miosina, de peso molecular 169.000 Da; o outro componente, mais abundante (banda e) de peso molecular próximo a 66.200 Da, fração protéica correspondente a actina. O resultado é semelhante ao publicado por CUQ (1995) para proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico no estado pós-rigor, e difere dos resultados encontrados por MONTERREY-Q (1998), que extraiu proteínas no estado pré-rigor. A diferença nos resultados pode ser atribuída ao estado pós-rigor mortis, no qual a proteína foi extraída. Outra provável causa é o método SDS-PAGE, que não diferencia a miosina e actina livres, presentes no estado pré-rigor e provenientes da separação desordenada da actomiosina formada no estado pós-rigor mortis.

Observando na Figura (2.3) as bandas (a) e (b), seguidas pelo aparecimento de linhas finas (bandas c e d), sugerem uma possível proteólise das cadeias pesadas de miosina. Outra possível evidência de proteólise é caracterizada pela presença das bandas (h) e (i) que tanto podem corresponder à troponina T ou a fragmentos das cadeias leves de miosina e também a frações de sub- unidades de β -actina, uma vez que os pesos moleculares destes peptídeos se confundem.

Os géis de eletroforese SDS-PAGE da amostra de proteínas miofibrilares foram analisados por densitometria, e os resultados são apresentados na Figura (2.4). As letras minúsculas correspondem às mesmas das bandas na Figura (2.3), observa-se que para as bandas (c), (d), (f) e (h) não foram determinados seus pesos moleculares.

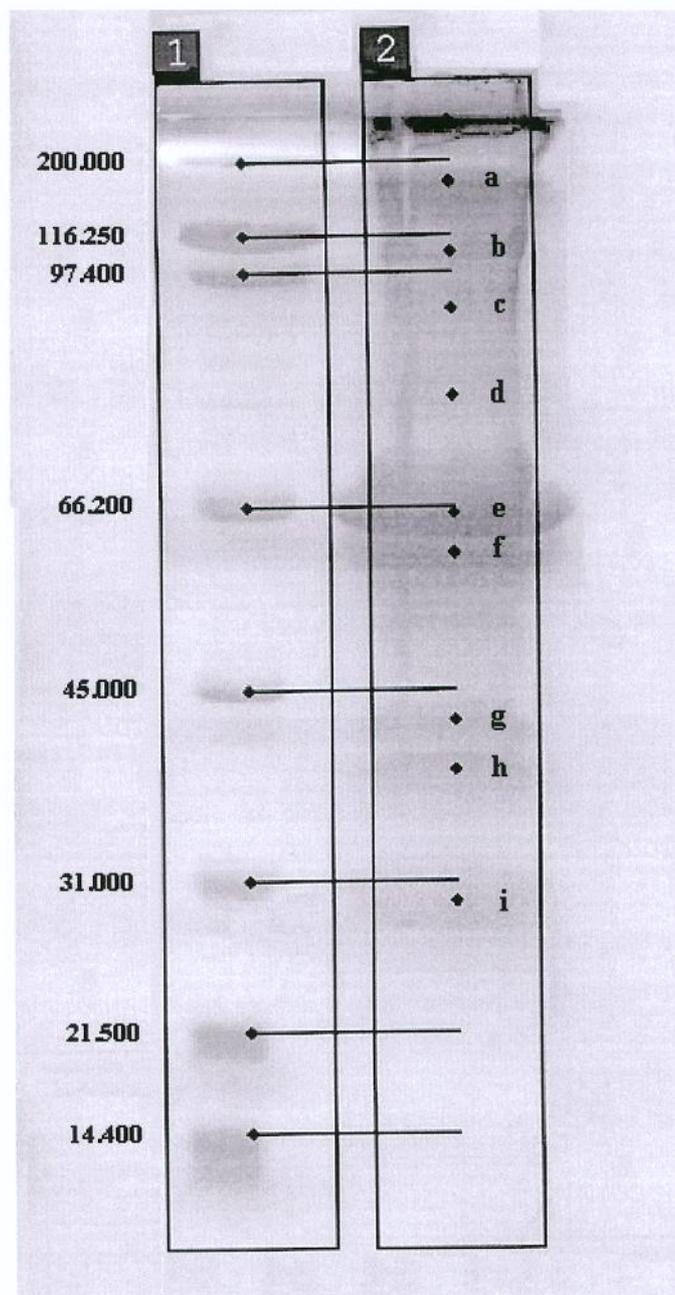


Figura 2.3 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de proteínas miofibrilares extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, *pós-rigor mortis*. 1- Padrões BIO-RAD: Miosina (200.000 Da); β -galactosidase (116.250 Da); Fosforilase B (97.400 Da); Soro albumina (66.200 Da); Ovo albumina (45.000 Da); Anidrase carbônica (31.000 Da); Inibidor tripsina (21.500 Da); Lisozima (14.400 Da) e 2- Proteínas miofibrilares de carne bovina.

Mas, entre as frações identificadas, a caracterização das proteínas miofibrilares (miosina e actina) ficou evidente, com o aparecimento da cadeia pesada de miosina (banda a) e de seus fragmentos de cadeias pesadas (banda b), actina (banda e) e fragmentos de cadeias leves de miosina (banda h).

Tabela 2.3 – Bandas apresentadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de músculo *Semitendinosus* bovino obtidas por centrifugação diferencial.

Banda	Peso Molecular (Da)	Proteína
a	168.918	Cadeia pesada miosina
b	146.402	Proteína C
c	124.244	Fragmento cadeia pesada de miosina e α -actinina
d	109.051	Actinina e proteína M
e	67.217	Actina
f	61.274	Actina e tropomiosina
g	41.781	α -tropomiosina
h	36.982	Troponina T
i	27.316	Cadeia leve miosina

Fonte: McCORMICK (1995).

MONTERREY (1998) analisou por eletroforese SDS-PAGE e estimou os pesos moleculares por densitometria das proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo (jovem e adulta), extraídas no estado *pré-rigor* por sucessivas lavagens em água. Na eletroforese em gel de poliacrilamida dessas amostras observou-se que a proteólise, caracterizada pelo aparecimento de linhas finas, difere em relação à amostra analisada neste trabalho. A principal causa deve-se ao estado em que a amostra de tilápia-do-Nilo foi processada, *pré-rigor*, enquanto que para as proteínas miofibrilares, de músculo bovino, este processo realizou-se no estado *pós-rigor mortis*. Neste estado, o músculo sofreu transformações bioquímicas responsáveis pelo aparecimento do complexo actina-miosina e liberação de enzimas proteolíticas que provocam a formação de frações peptídicas de baixo peso molecular.

A provável ação enzimática sobre as proteínas miofibrilares de músculo de origem

bovina apresentam vantagens como o aumento de ligações dissulfídicas (-S-S-), o que fortalece a rede protéica (OKAMOTO, 1978). Outra suposta vantagem é o aparecimento de frações peptídicas de baixo peso molecular, que podem auxiliar na formação da rede protéica.

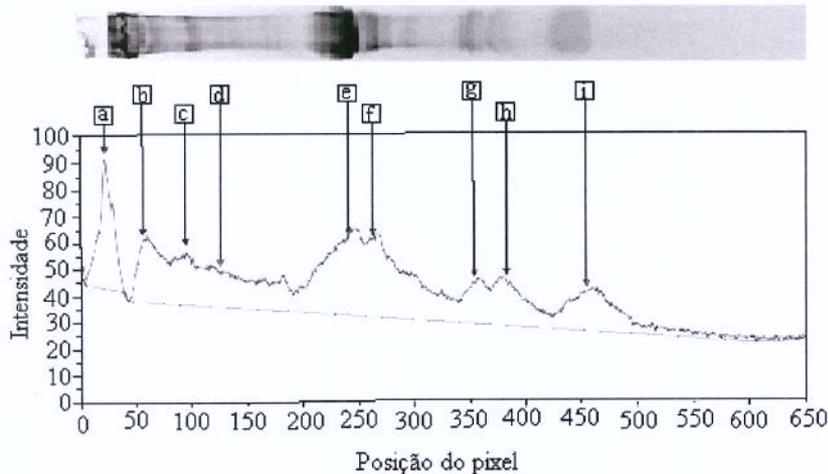


Figura 2.4 – Resultado da densitometria da eletroforese em SDS-PAGE de proteínas miofibrilares extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, *pós-rigor mortis*.

3.3 AMINOGRAMA

O perfil dos aminoácidos da amostra de proteínas miofibrilares liofilizadas extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, *pós-rigor mortis*, está apresentado no aminograma (Figura 2.5).

A Tabela (2.4) mostra a composição de aminoácidos da amostra de proteínas miofibrilares de origem bovina obtida neste trabalho, e compara os mesmos com os valores encontrados na tabela da FAO (1970), para o músculo comestível fresco bovino. Observa-se que os valores obtidos de músculo *Semitendinosus* apresentam bem próximos, exceto as quantidades de cistina que tem valores bem diferentes (12,05 e 1,28 g aa/100 g proteína), respectivamente para o músculo no estado *pós-rigor* e *pré-rigor*.

Na Tabela (2.5) observa-se que os aminoácidos encontrados em maiores concentrações foram o ácido glutâmico (14,95%), cistina (10,10%), lisina (8,17%), leucina (6,89%), ácido aspártico (5,58%) e arginina (5,53%). A amostra apresenta também porcentagens de amônia (0,67%), provavelmente resultante do processo de degradação dos aminoácidos em uréia, como: asparagina, glutamina e triptofano, na etapa de hidrólise ácida em que a amostra é submetida para a análise, e por isso, não são quantificados neste método.

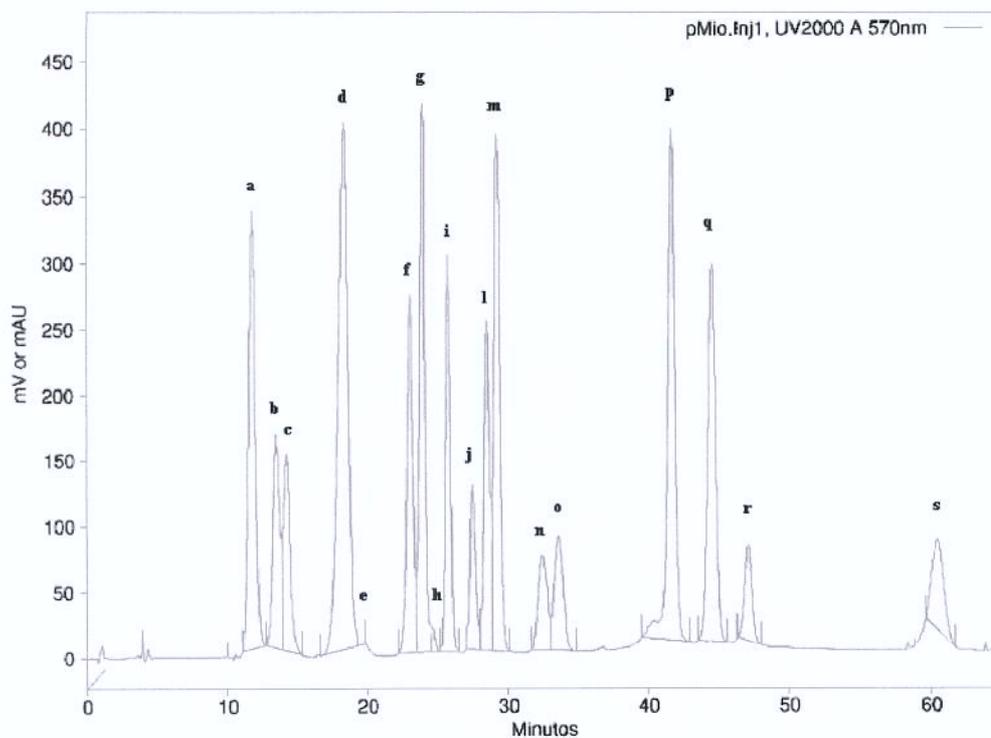


Figura 2.5 – Aminograma do concentrado de proteínas miofibrilares bovina extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, *pós-rigor mortis*. a- Asparagina; b- Treonina; c- Serina; d- Ácido glutâmico; e- Prolina; f- Glicina; g- Alanina; h- Cistina; i- Valina; j- Metionina; l- Isoleucina; m- Leucina; n- Tirosina; o- Fenilalanina; p- Lisina; q- Amônia; r- Histidina; s- Arginina.

Os aminoácidos são classificados (CHEFTEL et al., 1989) em: polares ionizáveis (Asp, Arg, Glu, His, Lys, Gly), polares não ionizáveis (Cys, Ser, Thr), apolares (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Tyr, Val) e covalentes (Cistina). A cisteína apesar de ser um aminoácido polar não-ionizado contribuirá preferencialmente para formação de pontes dissulfídicas e formação de cistina.

Tabela 2.4 – Composição de aminoácidos das proteínas miofibrilares bovino.

Aminoácidos	Músculo	
	<i>Semitendinosus</i>	Comestível fresco*
	g Aa**/100 g Proteína	
Cisteína (Cys)	-	-
Serina (Ser)	2,02	4,03
Treonina (Thr)	4,16	4,59
Ác. Aspártico (Asp)	6,66	8,98
Arginina (Arg)	6,60	6,32
Ác. Glutâmico (Glu)	17,83	15,27
Histidina (His)	2,62	3,41
Lisina (Lys)	9,74	8,89
Glicina (Gly)	1,92	4,86
Alanina (Ala)	4,10	5,84
Isoleucina (Ile)	5,21	4,81
Leucina (Leu)	8,22	8,11
Metionina (Met)	2,99	2,70
Fenil-alanina (Phe)	3,73	4,40
Prolina (Pro)	3,01	3,77
Tirosina (Tyr)	3,32	3,60
Valina (Val)	4,96	5,01
Cistina	12,05	1,28
Total	99,14	95,85

*Fonte: FAO - Nutritional Studies (1970); **Aa: Aminoácidos.

Considerando os diferentes tipos de interações entre as cadeias laterais e a água pode-se calcular a energia de ligação máxima, e assim obtêm-se as contribuições teóricas de cada grupo. Para o cálculo da contribuição do conjunto de cada interação foram utilizados os valores sugeridos por CUQ (1996) para energias de ligação: 25 kJ/mol para as interações

polares não-ionizáveis, 62 kJ/mol para as iônicas, 8 kJ/mol para as hidrofóbicas e 350 kJ/mol para as covalentes. A quantidade de aminoácidos, expresso em Mol Aa/100 mol Aa, das proteínas miofibrilares de origem bovina obtidas a partir do aminograma (Figura 2.5), estão apresentadas na Tabela (2.6).

Tabela 2.5 – Concentração de aminoácidos e potencial energético máximo teórico das interações na rede protéica de proteínas miofibrilares, extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, obtidas por centrifugação diferencial e energia de interações.

Aminoácidos	g Aa*/100 g	Tipos de interações	Tipos de ligações
Cisteína (Cys)	-		
Serina (Ser)	1,69		
Treonina (Thr)	3,49		
Subtotal	5,18	polares não ionizáveis	pontes de hidrogênio
Ác. Aspártico (Asp)	5,58		
Arginina (Arg)	5,53		
Ác. Glutâmico (Glu)	14,95		
Histidina (His)	2,20		
Lisina (Lys)	8,17		
Glicina (Gly)	1,61		
Subtotal	38,04	polares ionizáveis	iônica
Alanina (Ala)	3,44		
Isoleucina (Ile)	4,37		
Leucina (Leu)	6,89		
Metionina (Met)	2,51		
Fenil-alanina (Phe)	3,13		
Prolina (Pro)	2,52		
Tirosina (Tyr)	2,78		
Valina (Val)	4,16		
Subtotal	29,80	apolares	hidrofóbicas
Cistina	10,10	covalentes	pontes dissulfídicas
Amônia	0,67		
Total	83,81		

*Aa: Aminoácidos.

O ácido glutâmico (16,16%, Mol Aa/100 mol Aa), a cistina (13,26%), a lisina (8,89%), a leucina (8,35%), seguida do ácido aspártico (6,67%) e arginina (5,05%) são os aminoácidos

em maiores quantidades. O alto conteúdo molar de cistina (13,26%) implica numa alta densidade de ligações covalentes, dissulfeto (-S-S-), que sucedem a nível intra e intermolecular de alta energia de interação. Entretanto, esta alta densidade de energia das ligações dissulfídicas tem a desvantagem da proteína tornar-se menos solúvel (OKAMOTO, 1978), além, de caracterizar a provável presença da actomiosina de estrutura quartenária na amostra.

Tabela 2.6 – Quantidade de aminoácidos e contribuições de energia das principais ligações das proteínas miofibrilares, extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino, obtidas por centrifugação diferencial.

Tipos de ligações	Aa*	Mol Aa/100 mol Aa	Energia das interações (kJ/mol)	Energia das interações (kJ/100 mol Aa)	Energia (kJ/100 KJ)
	Cys	-			
	Ser	2,56			
	Thr	4,66			
Ponte de Hidrogênio		7,22	25	180,43	2,27
	Asp	6,67			
	Arg	5,05			
	Glu	16,16			
	His	2,30			
	Lys	8,89			
	Gly	3,41			
Iônica		45,88	62,00	2844,65	35,72
	Ala	6,14			
	Ile	5,30			
	Leu	8,35			
	Met	2,68			
	Phe	3,01			
	Pro	3,48			
	Tyr	2,44			
	Val	5,65			
Hidrófoba		37,05	8,00	296,38	3,72
Covalente	Cistina	13,26	350,00	4642,13	58,29

*Aa - Aminoácido

A maior contribuição energética dos aminoácidos, aparentemente (Tabela 2.6) são as provenientes de ligações covalentes com um percentual de 58,29% das interações, seguidas

das interações iônicas (35,72%). As interações hidrofóbicas (3,72%) e as interações de pontes de hidrogênio (2,27%) apresentaram percentuais mais baixos.

Foi observada uma alta densidade de ligações iônicas, similares aos resultados encontrados por CUQ (1996) e MONTERREY-Q (1998). Por outro lado, os aminoácidos não ionizáveis polares que contribuem para a formação de pontes de hidrogênio entre proteína-proteína, responsáveis pela estrutura secundária e terciária, apresentam um valor baixo (7,22%), quando são comparados a valores de proteínas miofibrilares bovina no estado *pós-rigor*. O valor encontrado na literatura para proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo, no estado *pré-rigor* é de 10,39% (mol aa/100 mol aa) (MONTERREY-Q, 1998). A diminuição desses aminoácidos implica no aumento das forças de coesão, rigidez e da baixa flexibilidade da rede protéica (BANKER, 1966). Portanto a diferença no percentual de aminoácidos entre a proteína bovina e as de peixes, deve-se ao estado em que as proteínas miofibrilares foram extraídas.

O grande número de ligações hidrofóbicas (37,05%) aumenta a proporção de resíduos de aminoácidos de cadeias laterais apolares que não interagem com as moléculas de água. Estas cadeias laterais tendem a se associar em regiões hidrofóbicas no interior da proteína, conseqüentemente a penetração de moléculas de água polar encontra resistência.

O processo de “salting-out” que ocorreu na etapa de extração da proteína pode ter intensificado a agregação e também aumentando o conteúdo de NaCl (0,09 moles) remanescente da etapa. Uma vez tendo a presença de eletrólitos, as moléculas de água ligaram-se mais fortemente ao sal em detrimento de ligar-se às proteínas. Desta maneira as interações proteína-proteína são favorecidas e isto pode conduzir a uma agregação. Entretanto, a proteína torna-se menos solúvel.

Nota-se também um percentual de ligações covalentes (13,26%), superior ao resultado de 0,36% observado por MONTERREY (1998) que trabalhou com proteínas miofibrilares de peixe *pré-rigor* liofilizadas. As diferenças do percentual de aminoácidos hidrofóbicos e iônicos entre as proteínas miofibrilares de peixe e bovino é praticamente inversa (46,3 e 35,5%) e (37,05 e 45,88%) e a diferença entre o percentual energético é

(12,5 e 74,4%) e (3,72 e 35,72), respectivamente. A quantidade percentual de ligações iônicas nas proteínas miofibrilares bovinas é maior, mas a sua contribuição energética em relação à de peixe é a metade, fato interessante que pode informar a importância da densidade de ligações do tipo iônicas.

4. CONCLUSÃO

O método utilizado para extração, centrifugação diferencial em soluções salinas de diferentes concentrações modificadas, foi eficiente com um aproveitamento de 84,26% de proteína e rendimento aproximado de 46%.

O método de extração obteve boa separação da fração de gordura, em contrapartida apresentou um alto teor de cinzas (7,42%), devido aos resíduos de sais presentes na amostra.

A eletroforese identificou a amostra como tendo o perfil eletroforético de proteínas miofibrilares, que sofreu variações de temperatura durante a comercialização. Aparentemente, o processo de liofilização conservou a amostra.

As proteínas miofibrilares apresentaram grande número de ligações iônicas, 45%, contra 37% de ligações apolares e um percentual bem menor, de 7,22% de pontes de hidrogênio. Isto confirma a origem da proteína de músculo *pós-rigor mortis* e também o expressivo percentual de ligações covalentes (13,26%).

Apesar das ligações dissulfídicas apresentarem 58,29% de contribuição energética, o pH (2,8) de solubilização não sofreu grande alteração em relação às proteínas miofibrilares pré-rigor de peixe confirmando a influência, principalmente, de ligações iônicas na solubilização e na capacidade de entrelaçamento para a formação da rede protéica.

5. BIBLIOGRAFIA

- ACTON, J.C.; HANNA, M.A.; SATTERLEE, L.D. Heat-induced gelation and protein-protein interaction of actomyosin. **Journal of Food Biochemistry**. v.5, n.2, p.101-113, 1981.
- ALAIS, C.; LINDEN, G. **Food Biochemistry**. Londres: Ellis Horwood, 1991, 222p.
- AOAC. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 14ª Edição. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1980.
- ASGHAR, A.; SAMEJIMA, K.; YASUI, T. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. **CRC Critical Review Food Science and Nutrition**. v.22, n.1, p.27-106, 1985.
- BANKER, G.S. Film coating theory and practice. **Journal Pharmaceutical**. v.55, p.81-89, 1966.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemical Physiological**. v.37, p.911-917, 1959.
- BORDERIAS, A.J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. **Revista de Agroquímica e Tecnología de Alimentos**. v.28, n.2, p.159-169, jun. 1988.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, Modificaciones**. Zaragoza:Acribia, 1989. p.346.
- CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**. v.60, n.6, p.1369-1374, nov./dez. 1995.
- CUQ, B. **Mise en forme et caractérisation de biomatériaux à base de protéines myofibrillaires**. Montpellier: Université Montpellier II, 1996. 213p. (Tese, Doctorado em Biochimie et technologies Alimentaires).
- DECKER, E.A.; XIONG, Y.L.; CALVERT, J.T.; CRUM, A.D.; BLANCHARD, S.P. Chemical, physical, and functional properties of oxidized turkey white muscle myofibrillar proteins. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.41, n.2, p.186-189, mar. 1993.
- EISELE, T.A.; BREKKE, C.J. Chemical and modification and functional properties of acylated beef heart myofibrillar proteins. **Journal of Food Science**. v.46, n.4, p.1095-1102, jul./ago. 1981.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome. n.24, 1970.

- HAMM, R.; DEATHERAGE, F.E. Changes in hydration, solubility and changes of muscle proteins during heating of meat. **Food Research**. v.25, p.587, 1960.
- ISHIOROSHI, M.; SAMEJIMA, K.; YASUI, T. Heat-induced gelation of myosin: factors of pH and salt concentrations. **Journal of Food Science**. v.44, n.6, p.1280-1284, nov./dez.1979.
- KENNEY, P.B.; KASTENER, C.L.; KROPF, D.H. Muscle washing and raw material source affect quality and physicochemical properties of low-salt, low-fat, restructured beef. **Journal of Food Science**. v.57, n.3, p.545-551, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAN, Y.H.; NOVAKOFSKI, J.; McCUSKER, R.H.; BREWER, M.S.; CARR, T.R.; McKEITH, F.K. Thermal gelation of stretched and cold-shortened bovine sternomandibularis muscle and myofibrils. **Journal of Food Science**. v.60, n.4, p.661-663, jul./ago. 1995.
- LUMRY, R. Some recent ideas about the nature of the interactions between proteins and liquid water. **Journal of Food Science**. v.38, n.5, p.744-755, 1973.
- McCORMICK, R.J. Structure and properties of tissues. In: Meat poultry and seafood technology. Ed. M.D. Kinsman, Chapman & Hall, New York, 1995, 394p.
- McHUGH, T. H.; KROCHTA, J.M. Sorbitol vs glicerol-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, abr. 1994.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S. **Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes**. Pirassununga: Universidade de São Paulo-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. 1998. 83p. Dissertação de Mestrado.
- NEVES, E.S. **Estudo da transferência de massa em carne bovina salgada desidratada**. Campinas: UNICAMP, 1998. 115p. Dissertação de mestrado.
- OCUNO, D.; SOBRAL, P.J.A. Preparo de proteínas miofibrilares de carne e elaboração de biofilmes com dois tipos de ácidos: propriedades mecânicas. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.1, n.1 e 2, p.44-52, jan/dez. 1998.
- OKAMOTO, S. Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**. v.23, n.5, p.257-262, maio. 1978.
- PAUL, P.C.; PALMER, H.H. Colloidal systems and emulsions. In: **Food Theory and applications**. P.C. PAUL and H.H. PALMER, eds., Cap.2, p.95. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1972.

- REGENSTEIN, J.M.; STAMM, J.R. Factors affecting the sodium chloride extractability of muscle proteins from chicken breast, trout white and lobster tail muscles. **Journal of Food Biochemisry**. v.3, p.191-204, 1979.
- SADOWSKA, M.; SIKORSKI, Z.E. Interaction of different animal proteins in the formation of gels. **Lebensmittel - Wissenschaft Technologil**. v.9, n.4, p.207-210, ago./set. 1976.
- SAMEJIMA, K.; HASHIMOTO, Y.; YASUI, T.; FUKAZAWA, T. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin and myosin-subunits in a saline model system. **Journal of Food Science**. v.34, n.3, p.242, 1969.
- SAMEJIMA, K.; WOLFE, F.H. Degradation of myofibrillar protein components during postmortem aging of chicken muscle. **Journal of Food Science**. v.41, n.1, p.250-254, 1976.
- SAMEJIMA, K; YAMAUCHI, H.; ASGHAR, A.; YASUI, T. Role of myosin heavy chains from rabbit skeletal muscle in the heat-induced gelation mechanism. **Agricultural Biology Chemistry** v.48, p.2225-2232, 1984.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.
- SCHIMIDT, G.R., MAWSON, R.F.; SIEGEL, D.C. Functionality of a protein matrix in comminuted meat products. **Food Technology**. v.35, n.5, p.235-238, maio.1981.
- SMITH, D.M. Meat proteins: functional properties in comminuted meat products. **Food Technology**. v.42, n.5, p.116-121, maio.1988.
- STANLEY, D.W.; STONE, A.P.; HULTIN, H.O. Solubility of beef and chicken myofibrillar proteins in low ionic strength media. **Journal Agricultural of Food Chemistry**. v.42, n.4, p.863-867, abr. 1994.
- WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker, 1973. 636p.
- WHITING, R.C. Ingredients and processing factorsthat control muscle protein functionality. **Food Technology**. v.42, p.104-114, 210, 1988.
- XIONG, Y.L. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. **CRC Critical Review in Food Science and Nutrition**. v.34, n.3, p.293-320, maio. 1994.
- YATES, L.D.; DUTSON, T.R.; CALDWELL, J.; CARPENTER, Z.L. Effect of temperature and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. **Meat Science**. v.9, n.2, p.157-179, 1983.

ZIEGLER, G.R.; ACTON, J.C. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue.
Food Technology. v.38, n.5, p.77-82, maio. 1984.

CAPÍTULO 3

OBTENÇÃO DE BIOFILMES

1. INTRODUÇÃO

A elaboração de filmes comestíveis a partir de biopolímeros como polissacarídeos e proteínas têm aumentado nos últimos anos e tem sido alvo de pesquisas para seu uso potencial em proteção e preservação de alimentos. Inúmeros métodos de elaboração de filmes comestíveis, bem como suas propriedades e aplicações, foram revisados na literatura (GONTARD & GUILBERT, 1996; GUILBERT, 1986; KESTER & FENNEMA, 1986). Nota-se que as macromoléculas mais utilizadas são os carboidratos. Dentre as proteínas, destacam-se as de origem vegetal, como o glúten e a zeína. As proteínas de origem animal mais estudadas em biofilmes são as proteínas do soro do leite (McHUGH & KROCHTA, 1994). Estudos sobre formação e propriedades foram realizados por DANIELS (1973); GUILBERT (1986) e GONTARD & GUILBERT (1996).

O tipo de formulação utilizada interfere na natureza e propriedades dos filmes (BANKER, 1966). A disposição das moléculas e os enlaces entre as cadeias poliméricas determinam o entrelaçamento dos segmentos moleculares, bem como as propriedades físicas dos filmes (BANKER, 1966). As propriedades mecânicas dependem do tipo de polímero, bem como da sua coesão estrutural. O grau de coesão, de importância fundamental para as suas propriedades, depende da estrutura química das macromoléculas, da presença de plasticizantes e de agentes de reticulação, além da natureza do solvente usado, do método de aplicação, do processo de eliminação do solvente (secagem) e da espessura do filme (GUILBERT, 1986). A organização da cadeia polimérica na matriz formadora do filme influencia a rigidez, a resistência e a flexibilidade.

Recentemente, as proteínas miofibrilares, particularmente as de peixe, vem ganhando interesse na tecnologia de biofilmes, devido a produção de filmes com propriedades funcionais promissoras (CUQ et al., 1995; MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, 2000; SOBRAL et al., 1997 e MONTERREY-Q, 1998). No entanto, as de origem bovina também tem apresentado propriedades funcionais interessantes para formação de filmes, como observado por OCUNO & SOBRAL (1998).

As proteínas miofibrilares têm alto peso molecular e um grande potencial de ligações intra e intermoleculares. Essas interações podem ser alteradas segundo o interesse, por mudanças no pH, por tratamento térmico ou por meio de aditivos (CHEFTEL et al., 1989). O tratamento térmico pode dissociar a proteína em subunidades, em maior ou menor grau dependendo da intensidade do tratamento, além de desnaturar as moléculas de proteínas, impedindo que essas retornem ao estado nativo. A estabilidade da proteína depende da concentração e do tipo de interações predominantes. A estabilidade é alcançada através de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas e ligações covalentes como pontes dissulfídicas (TEJADA, 1994). Os filmes de proteínas desnaturadas podem apresentar um decréscimo na permeabilidade e na solubilidade, e uma melhora das propriedades mecânicas (STUCHELL & KROCHTA, 1994). McHUGH et al. (1994) desenvolveram filmes a base de proteínas de soro, utilizando o tratamento térmico como indutor da formação de ligações dissulfídicas intermoleculares. No entanto, os filmes formados não tiveram diferenças significativas sobre a permeabilidade ao vapor de água nas temperaturas estudadas (75 e 100 °C) e apresentaram-se quebradiços, sendo necessário o uso de plasticizantes.

A incorporação de aditivos como os plasticizantes, ao filme, tem a finalidade de reduzir a característica quebradiça do material, reduzindo o número de interações entre cadeias adjacentes, aumentando os espaços intermoleculares, enfim, tornando as ligações e interações entre as moléculas mais fracas, e conseqüentemente, melhorando a característica de extensibilidade do mesmo (BANKER, 1966; GONTARD et al., 1992; MAHMOUD & SAVELLO, 1992). A adição de glicerol, por exemplo, na formulação de filmes a base de proteína de soro, teve influência tanto no teor de umidade como nas propriedades mecânicas (MAHMOUD & SAVELLO, 1992).

Materiais a base de proteínas podem então ser modificados para melhorar suas propriedades funcionais, notadamente aquelas relacionadas com as características da solução filmogênica e dos filmes formados (OSAWA & WALSH, 1993). Estudos experimentais de filmes formados a partir de proteína do soro, utilizando a enzima transglutaminase como agente reticulante apresentaram propriedades mecânicas (força e deformação), permeabilidade ao vapor de água e solubilidade, dependentes da posição em

que a enzima atua nas moléculas de proteínas, sua especificidade e monitoramento (MAHMOUD & SAVELLO, 1992, 1993). STUCHELL & KROCHTA (1994) estudaram os efeitos da enzima peroxidase em filmes formados a partir de proteínas isoladas de soja e não observaram resultados satisfatórios. Eles verificaram a necessidade da enzima ter sítios de atuação específicos, como o da transglutaminase.

Uma das principais propriedades de barreiras, de interesse para filmes comestíveis, é a permeabilidade ao vapor de água, seguida, das propriedades de permeabilidade aos gases (CO_2 e O_2) e solutos. A permeabilidade é definida pela ASTM E96-80 como a taxa de transmissão de vapor de água por unidade de área através do filme, de espessura conhecida, induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas; de temperatura e de umidade relativa especificada (ASTM, 1990). A permeabilidade a gases e ao vapor de água pode ocorrer por dois mecanismos: por difusão capilar e/ou molecular. A difusão capilar ocorre em materiais porosos, enquanto a difusão molecular é por mecanismo de transferência molecular: a água dissolve na matriz do filme e permeia através do filme direcionada pelo gradiente de pressão e a posterior dessorção do outro lado da superfície.

Em um meio contínuo, homogêneo e isotrópico, a permeabilidade (P) é dada pela Equação (1.1) citada no **(Cap. 1)**.

Na prática, a permeabilidade (P) da água através do material é determinada pela medida do estado estacionário, segundo a Equação (1.2) citada no **(Cap. 1)**.

A difusividade e solubilidade do permeante são influenciadas pela temperatura e umidade relativa. Mais ainda estes dois parâmetros dependem das características do filme, como: o tipo de forças dominantes na formação da rede protéica, o grau de ligações entre moléculas, as forças de coesão, os fatores estéricos que podem favorecer uma maior ou menor ligação entre moléculas de proteínas e a presença de plasticizante. O plasticizante, geralmente, por ter baixo peso molecular tem a característica de aumentar o volume livre, devido sua facilidade de penetração, e atua diminuindo as forças intermoleculares entre as cadeias de macromoléculas adjacentes, provocando redução da temperatura vítrea (T_g). Por outro lado, devido ao seu caráter hidrofílico, também acentua a fixação das moléculas de

água. Dessa maneira, promove uma modificação química e estrutural na matriz protéica, que altera o estado do material. Conseqüentemente, ocorre um aumento não somente da flexibilidade, mas uma diminuição da resistência do material (OCUNO & SOBRAL, 1998).

O estado do material como o cristalino ou gomoso, e fatores estéricos também podem influenciar a permeabilidade ao vapor de água. Visto que a Tg é uma medida da mobilidade molecular, pode-se dizer que no estado vítreo as moléculas estão próximas com movimentos restritos aumentando a resistência à passagem do permeante. Por outro lado, no estado gomoso tem-se uma mobilidade maior com aumento do volume livre, que facilita a entrada do permeante, com conseqüente aumento da permeabilidade ao vapor de água.

Filmes e coberturas comestíveis foram exaustivamente pesquisados por BIQUET & LABUZA (1998); DANIELS (1973); GUILBERT (1986); KESTER & FENNEMA, (1986). As propriedades básicas para uma boa barreira à umidade incluem: (1) uma estrutura física que restringe o processo de difusão, p.e. pequenos poros, e (2) a ausência de estrutura ou grupos funcionais similares à molécula permeante.

Recentemente CUQ et al.(1996,1997) e MONTERREY-Q (1998) verificaram que filmes a base de proteínas miofibrilares de peixe apresentaram uma boa barreira ao vapor de água. Entretanto, para obedecer a lei de Fick um polímero homogêneo deve ter permeabilidade constante com a espessura. Este comportamento não foi observado em filmes a base de proteínas miofibrilares. Resultados semelhantes foram observados em filmes comestíveis a base de celulose (PARK et al., 1993 e PARK & CHINNAM, 1995). Conseqüentemente, a estrutura de um mesmo filme apresenta comportamento diferente em função da espessura no qual é fabricado.

Considerando-se que no Brasil, a carne bovina é relativamente de baixo custo, e que existe uma considerável quantidade de proteínas residuárias, optou-se por estudar a elaboração de biofilmes comestíveis e/ou biodegradáveis a partir de proteínas miofibrilares extraídas de carne bovina (PMB). Assim, os objetivos deste trabalho foram descrever a elaboração de filmes comestíveis a base de PMB, analisar os efeitos do tratamento térmico, da concentração de plasticizante e do pH, e apresentar e discutir o efeito da formulação da solução filmogênica sobre as propriedades mecânicas, opacidade, permeabilidade e

solubilidade dos filmes formados, utilizando-se uma metodologia de superfície e resposta, para melhor avaliar os efeitos interativos; tendo em vista a falta de dados com relação a biofilmes de PMB e sabendo do seu potencial de utilização como uma macromolécula formadora de filmes comestíveis, um dos nossos objetivos foi obter informações, para melhor entender como as variáveis estudadas pH, concentração do plasticizante (Cg) e temperatura (T) influenciam as condições de formação e as propriedades mecânicas de força e deformação na ruptura; e funcionais como solubilidade, opacidade e permeabilidade ao vapor de água do filme. A partir deste conhecimento o objetivo final foi otimizar os efeitos dessas variáveis para obtenção de uma formulação ótima.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE

Utilizou-se o músculo *Semitendinosus*, adquirido em casa comercial local e pré-preparado de acordo com item 2.1 (**Cap. 2**). As amostras embaladas, foram armazenadas a temperatura de -18°C e utilizadas num prazo máximo de 3 meses.

As proteínas miofibrilares foram extraídas do músculo no estado pós-rigor, seguindo-se o método modificado de EISELE & BREKKE (1981), discutido no **Cap. 2**, item 2.1. Os resíduos, constituídos de proteínas miofibrilares, foram liofilizados em um liofilizador Heto-Holten (Modelo FD3) e acondicionados sob sílica gel, até a obtenção de um lote grande e homogêneo. Essas proteínas foram utilizadas em todos os experimentos, armazenadas à temperatura de 5°C .

2.2 FORMAÇÃO DO FILME

A elaboração dos filmes, segundo o método “casting”, consistiu inicialmente na formação de uma solução coloidal, contendo 1% (p/p) de proteínas miofibrilares de carne bovina (PMB), com agregado de glicerol 87% (Merck, Brasil), em proporções variáveis como plasticizante, e de ácido acético glacial 100% (Merk, Brasil) como ajustador de pH

para os vários tratamentos. A solução formadora de filme (SFF) foi aquecida à temperatura de 35 °C em banho maria (Ultratermostático, Modelo 111, FANEM, Brasil), para todos os ensaios. A concentração de glicerol adicionada foi relativa ao peso de proteína dissolvida na solução, ou seja, porcentagem de plasticizante por porcentagem de proteína na solução (% peso plasticizante/% peso proteína). O pH foi ajustado com ácido acético antes do tratamento térmico e depois da adição do glicerol, medido com um pHmetro de sensor integrado (SENTRON, Modelo 2001pH, Tecnal, Brasil). A duração do tratamento térmico dado a todos os ensaios foi de 45 minutos. Todos os componentes foram misturados e agitados no homogeneizador (Fisatom, Brasil). A solução do filme foi preparada sob vácuo para evitar formação de bolhas.

As faixas de pH, concentração do plasticizante (Cg) e da temperatura (T) que foram realizados os ensaios estão apresentadas na Tabela (3.1). Estudos anteriores de CUQ et al. (1995), com sardinha do Atlântico, mostraram que a formação de uma solução homogênea formadora de filme requer o uso de condições ácidas ou básicas. Optamos pela condição ácida por formar filmes com propriedades sensoriais melhores. Os valores das variáveis independentes foram estabelecidos através de testes preliminares e derivadas de observações de CUQ et al. (1995).

A solução formadora de filme (SFF) foi pipetada e espalhada imediatamente em placas retangulares (9,2 x 17,9 cm) de acrílico. O volume de solução colocado na placa foi calculado de modo a obter uma espessura constante. Com este procedimento foi possível obter filmes de espessuras controladas e constantes ($0,040 \pm 0,005$ mm), medidas em 15 posições diferentes, 10 e 5, no sentido de maior e menor comprimento do filme, respectivamente, com um micrômetro (Modelo Tesa, Suíça).

As soluções filmogênicas foram submetidas à desidratação em estufa de ventilação forçada (Modelo 320-SE, FANEM, Brasil), em temperatura de 37 °C/18 h, para evaporar os solventes (ácido acético e água) e formar o filme.

Todos os filmes do experimento foram condicionados a 75% de umidade relativa (UR), utilizando uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), a 25 °C/48 h, antes das caracterizações.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

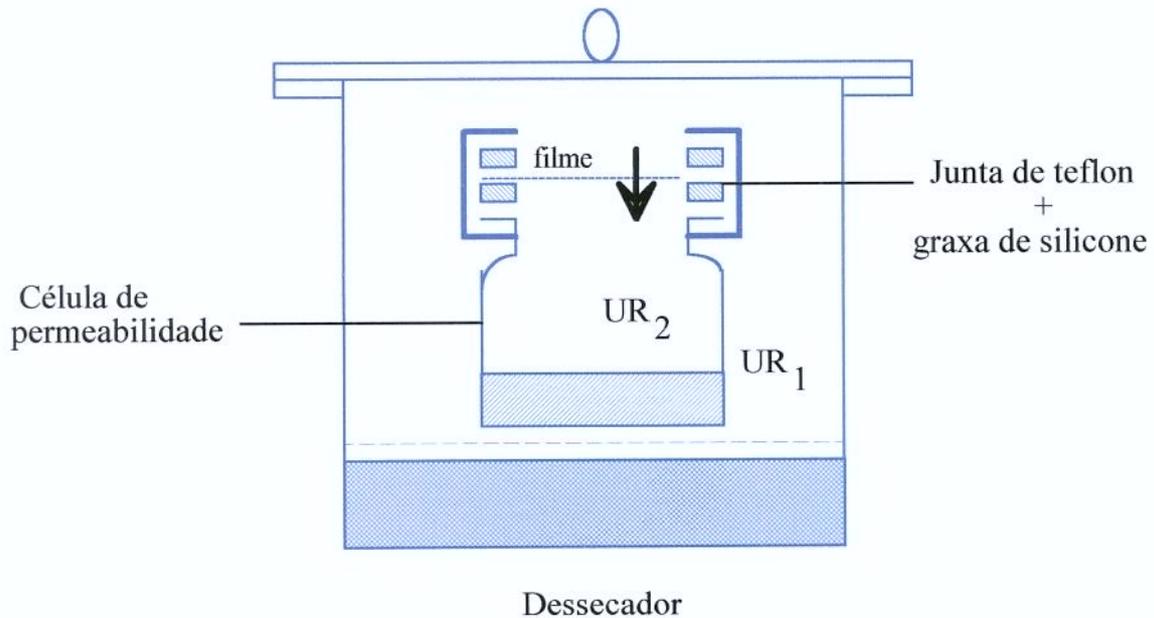
A determinação da **solubilidade** dos filmes em água foi realizada segundo a metodologia proposta por GONTARD et al. (1992). Três discos de cada amostra de filme, com 2 cm de diâmetro, previamente pesado, foram imersos em 50 ml de água contendo azida sódica (0,02 % p/v), a 25 °C, e mantidos por 24 horas, sob agitação esporádica. A solubilidade foi calculada como a relação entre a matéria seca final e a matéria seca inicial, determinadas em estufa a 100°C/24 h (GONTARD et al., 1992).

A **opacidade** foi determinada usando-se um método padrão modificado (ASTM, 1988). As amostras foram colocadas dentro da célula espectrofotométrica adaptada para este método. O espectro de absorbância (entre 400 e 800 nm) foi registrado para cada amostra utilizando-se um espectrofotômetro (Modelo DU-Spectrophotometer, Beckman, USA). Os valores de opacidade foram obtidos por integração (programa Origin 3.5) da área sob a curva (absorbância *versus* comprimento de onda). A opacidade do filme foi expressa como unidades de absorbância por nanômetros (Ua.nm).

A **permeabilidade ao vapor de água** foi determinada utilizando-se o método padrão modificado ASTM E 96-80 (ASTM, 1990), de acordo com o procedimento apresentado por GONTARD (1991). As amostras de filmes foram fixadas em células de permeação de vidro, com abertura circular ($\phi=34$ mm), correspondendo à área do filme exposta para troca, vedada hermeticamente, e contendo sílica gel no seu interior (0% UR; 0 mmHg pressão do vapor de água), em ambiente climatizado a 25 °C. As células de permeação, foram em seguida, colocadas dentro de dessecadores contendo água destilada (100% UR; 32,23 mmHg pressão vapor da água). A difusão de umidade através do biofilme causou aumento de peso da célula, registrado em balança semi-analítica (Marte, modelo AS2000), em intervalos regulares. As determinações foram realizadas em triplicatas, conforme esquema da Figura (3.1), após as amostras chegarem as condições de estado estacionário (6 h foram suficientes).

A permeabilidade do vapor de água (P) foi calculada empregando-se a Equação (1.2) citada (Cap.1). A inclinação da curva é a taxa de permeação da área exposta de cada filme, g/t, obtida fazendo-se regressão linear, a partir do gráfico ganho de peso (g) da célula

de permeação em função do tempo de condicionamento (h), quando esses pontos sucessivos se ajustarem a uma reta e a taxa de velocidade ficar constante. A parte linear desta curva está associada ao regime estacionário de transferência de vapor de água através do filme.



■ Solução salina 1 ou água destilada

■ Solução saturada 2 dessecante

UR_1 : Umidade relativa mantida no dessecador pela solução saturada 1 ou água destilada

UR_2 : Umidade relativa mantida no copo de permeabilidade pela solução saturada 2 ou o dessecante

$UR_1 > UR_2$

↓ Transferência de vapor de água através do filme

FIGURA 3.1 - Esquema do Princípio de medida da permeabilidade ao vapor de água.

2.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS - FORÇA E DEFORMAÇÃO NA RUPTURA

As propriedades mecânicas dos filmes, como a força e a deformação na ruptura, em testes de perfuração, foram estudadas utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Stable Micro Systems, Inglaterra), segundo a metodologia de GONTARD et al. (1992); GONTARD et al. (1994). Os filmes foram cortados na forma de discos com 6 cm de diâmetro e fixados em uma célula com uma abertura circular na tampa, de 3,4 cm de diâmetro. O vidro foi perfurado anteriormente para evitar uma pressão de resistência contrária a força de perfuração. Um sensor cilíndrico de $\phi = 3$ mm foi deslocado perpendicularmente à superfície do filme, com velocidade constante (1,0 mm/s), até a ruptura do filme (GONTARD et al., 1992). As curvas de força contra deformação foram registradas. Os valores de força (N) e deformação (mm) no ponto de ruptura foram calculados no ponto de interrupção dessa curva.

2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Estudos experimentais de filmes comestíveis usando a metodologia de superfície e resposta (RSM) foram realizados por GONTARD et al. (1992) e CUQ et al. (1995). Esta foi utilizada, para análise dos efeitos dos seguintes parâmetros experimentais, que são as variáveis independentes, Cg (X_1), pH (X_2) e T (X_3), na formação dos filmes. Os valores das variáveis independentes foram fixados nas faixas: Cg (50-75%), pH (2,5-3,5) e T (35-75 °C), determinados através de testes preliminares e indicação da literatura (CUQ et al. 1995). Usou-se um planejamento fatorial 2^3 completo, com 4 repetições no ponto central (BARROS NETO et al., 1996). As variáveis dependentes, isto é as respostas, analisadas, foram as propriedades mecânicas - força (Y_1) e deformação (Y_2) na ruptura, a solubilidade (Y_3), a opacidade (Y_4) e a permeabilidade ao vapor de água (Y_5), nos filmes. Na Tabela (3.1) estão os valores das variáveis independentes, codificados e reais.

O RSM usado foi uma modificação do planejamento de BOX et al. (1978), na composição do ponto central para cada uma das três variáveis em cinco níveis. Os dados foram analisados seguindo um modelo de 2ª ordem para todas variáveis dependentes Y_n , (Equação 3.3).

$$Y_n = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (3.1)$$

Onde b_n são os parâmetros do modelo, e Y_n são todas as variáveis dependentes e x_n são as variáveis independentes. O modelo foi analisado pelo programa Statistica 5.0, para ajustar os pontos experimentais ao modelo quadrático, plotaram-se gráficos de superfícies de resposta e o tratamento estatístico, que inclui o nível de significância, analisado através dos coeficientes de correlação (R^2) e do teste F.

Tabela 3.1 – Planejamento experimental fatorial 2^3 completo.

Número de Experimento ^a	Variáveis independentes		
	Plasticizante (% g/g proteína seca)	pH	Temperatura (°C)
	Cg ^b (X ₁) ^c	pH (X ₂)	T (X ₃)
01 (16)	55,06 (-1)	2,7 (-1)	43,09 (-1)
02 (15)	69,94 (1)	2,7 (-1)	43,09 (-1)
03 (14)	55,06 (-1)	3,3 (1)	43,09 (-1)
04 (13)	69,94 (1)	3,3 (1)	43,09 (-1)
05 (12)	55,06 (-1)	2,7 (-1)	66,90 (1)
06 (11)	69,94 (1)	2,7 (-1)	66,90 (1)
07 (10)	55,06 (-1)	3,3 (1)	66,90 (1)
08 (09)	69,94 (1)	3,3 (1)	66,90 (1)
09 (05)	50,00 (-1,68)	3,0 (0)	55,00 (0)
10 (07)	75,00 (1,68)	3,0 (0)	55,00 (0)
11 (06)	62,50 (0)	2,5 (-1,68)	55,00 (0)
12 (08)	62,50 (0)	3,5 (1,68)	55,00 (0)
13 (18)	62,50 (0)	3,0 (0)	35,00 (-1,68)
14 (17)	62,50 (0)	3,0 (0)	75,00 (1,68)
15 (01)	62,50 (0)	3,0 (0)	55,00 (0)
16 (02)	62,50 (0)	3,0 (0)	55,00 (0)
17 (03)	62,50 (0)	3,0 (0)	55,00 (0)
18 (04)	62,50 (0)	3,0 (0)	55,00 (0)

^aOs valores entre parênteses apresentam a ordem em que foram realizados os ensaios.

^bConcentração de plasticizante na solução formadora de filme (g plasticizante/g proteína).

^cOs valores entre parênteses são os códigos dos níveis das variáveis independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espessura média dos filmes foi de $0,040 \pm 0,005$ mm. O controle desta medida é necessário para assegurar a confiança nas medidas obtidas de propriedades físicas, e a validade de comparações entre as diferentes formulações. O critério utilizado para medir a espessura dos filmes foi similar ao adotado por CUQ et al.(1995), porém, o número de espessuras medidas no filme, longitudinal e transversal foram 15 e 10, respectivamente.

Em geral todos os filmes formados se apresentaram com boa aparência, translúcidos, de fácil manuseio e com bom aspecto tátil, exceto para os filmes formados em pH 2,5 e à temperatura baixa de 35°C , que na Tabela (3.2) correspondem à formulação n^o 11 e à 13, respectivamente. A formulação n^o 13, a temperatura de 35°C , não formou o gel, sendo que a formulação de n^o 11 apresentou maior dificuldade em formar o filme, possivelmente por causa da grande quantidade de íons H^{+} adicionados à solução formadora, que pode ter agido sinergisticamente contrária à formação da rede protéica. A outra causa é a desnaturação da proteína e seu conseqüente desdobramento, expondo os grupos hidrofóbicos do interior das moléculas protéicas. Esses grupos aumentam a repulsão entre as moléculas, tornando-as mais acessíveis às moléculas de água do meio em detrimento das moléculas de H^{+} (CHEFTEL et al., 1989).

Os valores médios para as medidas das propriedades físicas: força e deformação na ruptura, opacidade, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade estão apresentados na Tabela (3.2). A Equação (3.1) foi o modelo de ajuste dos dados experimentais, para análise estatística, que permitiu observar a influência de todas as variáveis independentes sobre as propriedades estudadas dos filmes.

3.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS

3.1.1 FORÇA DE RUPTURA

No Anexo (A) se apresentam os dados estatísticos completos. Todos os dados foram analisados com as variáveis Cg, pH e T codificados.

Observa-se na Tabela (3.3) os efeitos estatisticamente significativos com probabilidade (p) de ocorrência no intervalo de confiança menor que 0,20 ($p < 0,20$), das variáveis pH e temperatura (T) sobre a força de ruptura dos filmes.

Tabela 3.2 – Respostas das variáveis dependentes sob as diferentes condições de formação do filme de espessura 40 μ m.

N ^o Experimento	Variáveis dependentes ^a				
	Força (N)	Deformação (mm)	Solubilidade (%) ^c	Opacidade (Ua.nm)	Permeabilidade (10 ⁻¹⁰) (mol*m/s*m ² *Pa)
	Y ₁ ^b	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
01	2,15	7,87	18,72	81,96	2,54
02	2,28	10,63	15,40	153,20	4,17
03	1,61	9,26	19,66	187,40	1,86
04	1,36	9,29	9,03	174,70	2,19
05	1,86	8,35	16,61	135,00	3,46
06	1,37	9,22	14,22	113,70	2,30
07	1,28	10,62	12,63	149,30	2,93
08	1,43	8,94	9,18	184,60	2,55
09	2,45	8,64	27,65	174,40	1,88
10	1,92	8,90	22,42	178,20	2,05
11	2,37	9,27	18,33	97,65	2,41
12	1,20	9,80	16,56	176,10	1,93
13	1,73	8,07	19,36	116,50	2,54
14	1,25	8,94	2,42	111,70	2,18
15	2,17	9,39	24,46	114,80	1,70
16	1,75	8,62	24,86	101,10	1,74
17	2,43	8,92	24,81	113,20	1,36
18	2,73	8,96	25,53	157,50	1,73

^aMédia de três repetições.

^bY₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ são as variáveis dependentes.

^c(%, b.s).

Verifica-se uma diminuição da força, em média, de 0,58 quando o pH passa de seu nível inferior 2,7 para seu nível superior 3,3. Na Tabela (3.4) estão apresentados os coeficientes significativos ($p > 0,20$) do modelo estatístico adotado. A Equação (3.2) mostra o modelo de força na ruptura em função dos parâmetros estudados pH e T.

$$\text{Força} = 2,21 - 0,28\text{pH} - 0,18\text{pH}^2 - 0,29\text{T}^2 \quad (3.2)$$

Tabela 3.3 – Efeito dos fatores sobre a força de ruptura calculados para o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Fator	Efeito (N)	Erro Padrão	p	
Linear	b_0	2,21*	0,16	0,000893
	pH	-0,58**	0,22	0,082366
Quadrático	pH x pH	-0,37***	0,23	0,200754
	T x T	-0,58**	0,23	0,084136

Valores estatisticamente significativos: * p>95%; ** p>90% e *** p>80% de confiança.

A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação (3.2) estão apresentados na Tabela (3.5). Verifica-se um coeficiente de correlação (0,85), e o F calculado (8,78), comparado ao $F_{(80\%,4,13)}$ tabelado (1,83) foi 4,8 vezes superior que o tabelado. Indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 80% de confiança.

Tabela 3.4 – Coeficientes de regressão calculados para a força de ruptura utilizando o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Fator	Coefficiente(N)	Erro Padrão	p	
Linear	b_0	2,21*	0,16	0,000893
	pH	-0,28**	0,11	0,082366
Quadrático	pH x pH	-0,18***	0,11	0,200754
	T x T	-0,29**	0,11	0,084136

Valores estatisticamente significativos: * p>95%; ** p>90% e *** p>80% de confiança.

A partir do modelo obtido (Equação 3.2) pode-se gerar as superfícies de Força vs pH e T. A Figura (3.1) é a representação da Equação (3.2), com os valores de pH e T codificados. Nota-se o efeito conjunto da temperatura de tratamento térmico e do pH sobre a força na ruptura. Pode-se confirmar o considerável efeito das condições de tratamento e da composição da solução filmogênica, nas propriedades mecânicas do filme.

Tabela 3.5 - Análise de variância do ajuste de um modelo linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a força de ruptura.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{Calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	2,89	4	0,72	8,78	1,83
Resíduos	1,07	13	0,08		
Falta de Ajuste	0,55	10	0,05		
Erro Puro	0,52	3	0,17		
Total	3,96	17			

Observa-se na Figura (3.1), que a força necessária à ruptura dos filmes atingiu um máximo de aproximadamente 2,5 N, entre 40 e 70 °C e 2,5 e 3,0 de pH. Esse comportamento dos biofilmes deve-se as prováveis mudanças que ocorrem com as macromoléculas de proteínas em função do pH e T. Essas mudanças podem ser explicadas por possíveis rearranjos estruturais causados pela variação do pH, que tem como consequência, uma exposição de grupos funcionais polares, dos resíduos de aminoácidos, permitindo interações diferenciadas entre as macromoléculas.

Outra explicação é o mecanismo de gelatinização das frações de miosina e actomiosina, que ocorre em duas fases: em temperaturas abaixo de 50 °C ocorre desnaturação protéica, enquanto que acima de 55 °C parece ocorrer agregação rápida, seguida da gelatinização (ZIEGLER & ACTON, 1984). Isso pode explicar o fato de o máximo da força estar em torno de 50 °C.

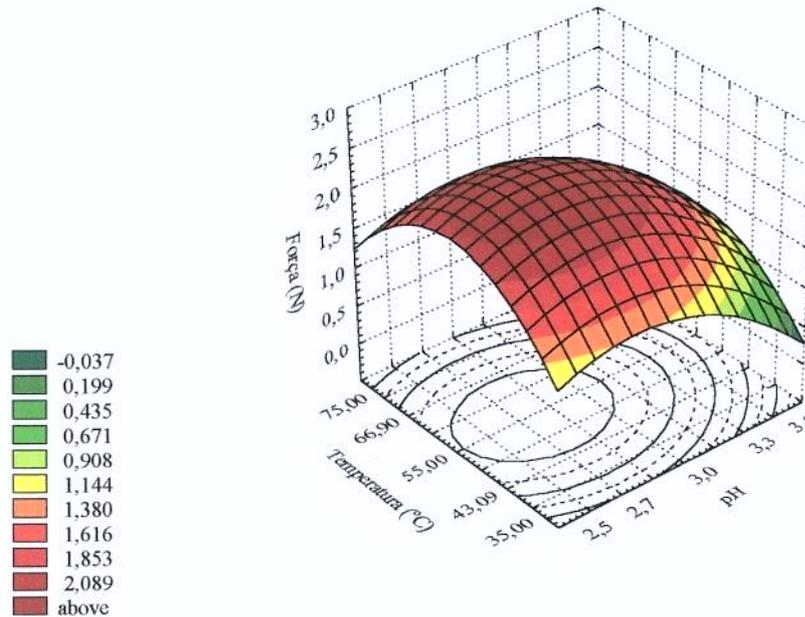


Figura 3.1. Efeito do pH e temperatura na solução formadora de filme sobre a força na ruptura, mantendo a concentração de plasticizante constante, $C_g=62,5\%$ e a concentração de proteína de 1% (p/p).

3.1.2 DEFORMAÇÃO NA RUPTURA

No Anexo (A) se apresentam os dados estatísticos completos. Na Tabela (3.6) estão mostrados os efeitos estatisticamente significativos ($p>0,20$), das variáveis plasticizante (C_g), pH e temperatura (T) sobre a deformação na ruptura dos filmes.

Verifica-se um aumento na deformação, em média, de 0,35 quando a concentração de plasticizante passa de seu nível inferior 55% para seu nível superior 70%. Enquanto o pH ao passar de 2,7 a 3,3 aumenta de 0,42 vezes a deformação na ruptura. Nota-se os fatores C_g e pH significativos no modelo linear e dentre os efeitos interativos destaca-se com a diminuição na deformação de 1,32, significativo a $p>0,05$. Na Tabela (3.7) estão apresentados os coeficientes significativos ($p>0,20$) do modelo estatístico adotado. A Equação (3.3) mostra o modelo deformação na ruptura em função dos parâmetros estudados C_g , pH e T.

Tabela 3.6 – Efeito dos fatores sobre a deformação na ruptura calculados para o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Fator		Efeito (mm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	8,87*	0,09	0,000003
	Cg	0,35**	0,17	0,131068
	pH	0,42**	0,17	0,087534
Interações	Cg x pH	-1,32*	0,22	0,009774
	Cg x T	-0,90**	0,22	0,027734
	pH x T	-0,48***	0,22	0,119163
Quadráticos	pH x pH	0,57**	0,17	0,043993

Valores estatisticamente significativos: * p>95%; ** p>90% e *** p>80% de confiança.

$$\begin{aligned} \text{Deformação} = & 8,87 + 0,18 Cg + 0,21 pH - 0,66 Cg \cdot pH - 0,45 Cg \cdot T + 0,24 pH \cdot T \\ & + 0,29 pH^2 \end{aligned} \quad (3.3)$$

Tabela 3.7 – Coeficientes de regressão calculados para a deformação na ruptura utilizando o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Efeito		Coeficiente (mm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	8,87*	0,09	0,000003
	Cg	0,18***	0,08	0,131068
	pH	0,21**	0,08	0,087534
Interações	Cg x pH	-0,66*	0,11	0,009774
	Cg x T	-0,45*	0,11	0,027734
	pH x T	0,24***	0,11	0,119163
Quadráticos	pH x pH	0,29*	0,08	0,043993

Valores estatisticamente significativos: * p>95%; ** p>90% e *** p>80% de confiança.

A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação (3.3) estão apresentados na Tabela (3.8). Verifica-se um coeficiente de correlação (0,93), e o F

calculado (11,03), comparado ao $F_{(80\%,6,11)}$ tabelado (1,83) foi 6 vezes superior ao tabelado. Indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 80% de confiança. A partir do modelo obtido (Equação 3.5) pode-se gerar as superfícies de respostas em função das variáveis significativas.

A deformação não apresentou uma região de ótimo em função das variáveis independentes. Analisando-se a Figura (3.2), observou-se que a deformação na ruptura apresentou uma tendência mínima a temperatura altas e pH baixos e a temperatura baixas e pH altos. No geral, a deformação na ruptura foi maior na região de alta temperatura (80 °C) e pH elevado (3,5).

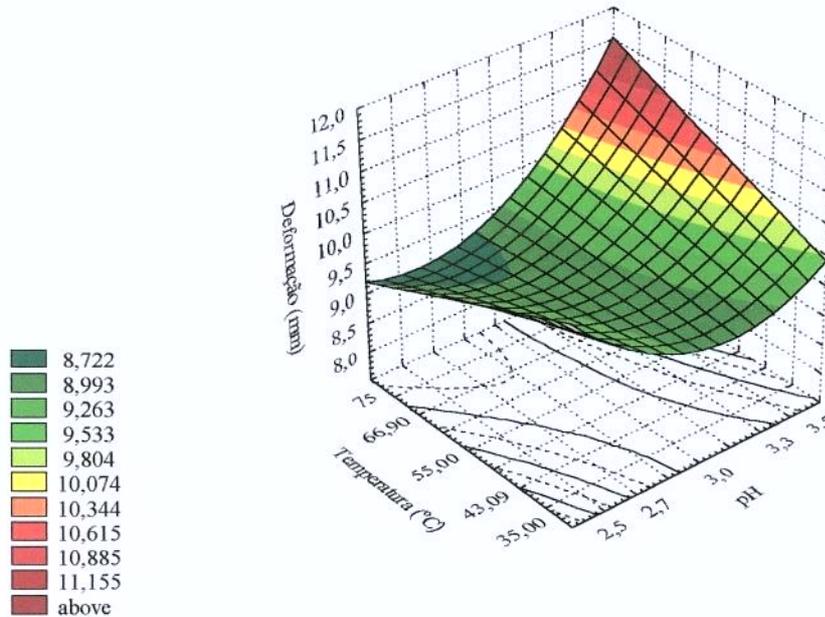


Figura 3.2. Efeito combinado da temperatura e do pH na solução formadora de filme sobre a deformação na ruptura dos filmes, mantendo a concentração de plasticizante constante, $C_g=62,5\%$ e a concentração de proteína de 1% (p/p).

Em relação ao efeito da temperatura e concentração de plasticizante na deformação na ruptura, observa-se na Figura (3.3), que os comportamentos se invertem entre baixos e elevados valores das variáveis independentes, de forma que o maior valor de deformação, da ordem de 11,0 mm, se encontrara na região de alta temperatura (80 °C) *versus* baixa

concentração do plasticizante (48%) e de baixa temperatura (30 °C) *versus* alta concentração do plasticizante (78%). Além disso, existe uma zona de máxima deformação, também entre valores de temperatura de 55 a 65 °C para todas as concentrações de plasticizante.

Tabela 3.8 - Análise de variância do ajuste de um modelo linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a deformação na ruptura.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{Calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	7,76	6	1,29	11,03	1,83
Resíduos	1,30	11	0,11		
Falta de Ajuste	0,10	8	0,12		
Erro Puro	0,30	3	0,10		
Total	9,05	17			

O efeito combinado do pH e da temperatura é também muito interessante, pois a inversão das propriedades observada na Figura (3.3) se repete na Figura (3.4), onde pode se observar o mesmo efeito da concentração de plasticizante e do pH sobre a deformação dos filmes.

Uma conseqüência do efeito do tratamento térmico sobre a proteína miofibrilar, descrita por ZIEGLER & ACTON (1984), ACTON et al.(1981), FOEGEDING (1988) e LAMBALLERIE et al.(1993) consiste no desdobramento da estrutura da proteína, mesmo que parcial. Este desdobramento permite um maior número de interações entre moléculas protéicas, tornando a rede mais resistente. Entretanto, o desdobramento parcial da cadeia quando presente o plasticizante facilita a sua entrada permitindo maior interação entre o plasticizante e a proteína, que provoca um efeito contrário à resistência.

As interações intermoleculares devem-se ao alto teor de grupos sulfidrilas (-SH) na molécula de miosina que são os responsáveis pelas ligações dissulfídicas.

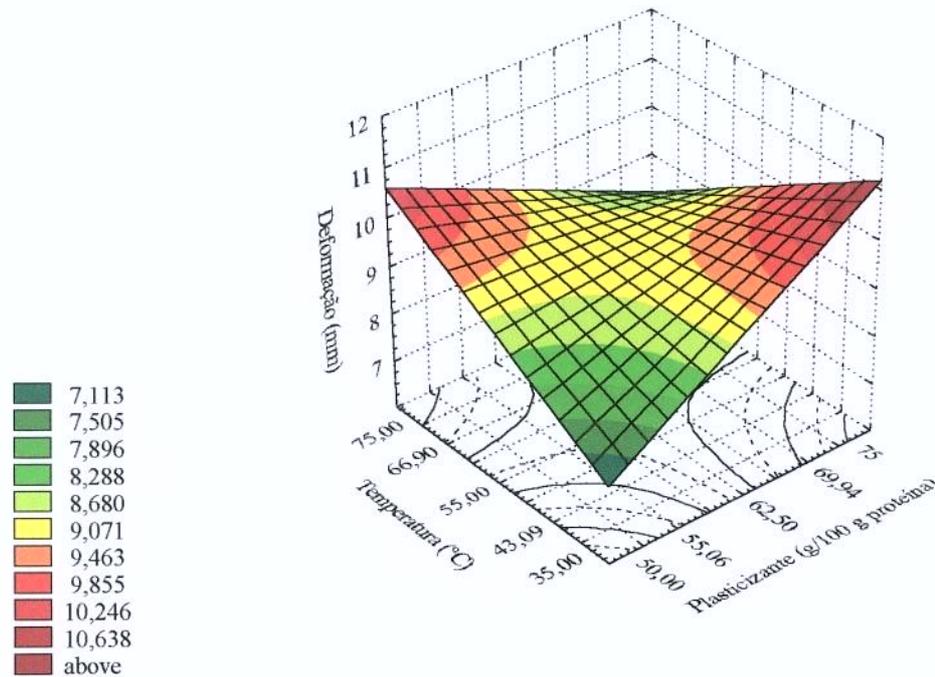


Figura 3.3. Efeito da concentração de plasticizante (Cg) e temperatura na solução formadora de filme sobre a deformação na ruptura dos filmes, mantendo o pH constante, pH=3,0 e a concentração de proteína de 1% (p/p).

Além disso, 55% dessas proteínas são constituídas de estrutura α -hélice, estabilizada por pontes de hidrogênio. Com o desdobramento, estas ligações ficam expostas, contribuindo assim para uma alta interação cooperativa entre as moléculas de proteína, aumentando a coesividade da rede protéica e conseqüentemente diminuindo a sua flexibilidade. O plasticizante glicerol, molécula hidrofílica, quando adicionado, é incorporado à rede de proteína, colocando-se entre as interações, ou seja, reduzindo as interações diretas e a proximidade entre as cadeias de proteínas (BANKER, 1966). Na Figura (3.2) podemos também observar este efeito da temperatura sobre a estrutura da proteína ao aproximarmos o pH da solução formadora do ponto isoelétrico (4,5), tornando a rede protéica mais frágil, facilitando o movimento das cadeias protéicas dos filmes. Resultados similares de comportamento foram encontrados por STUCHELL & KROCHTA (1994); MAHMOUD & SVELLO (1992); PARK et al. (1993) e GONTARD et al. (1993).

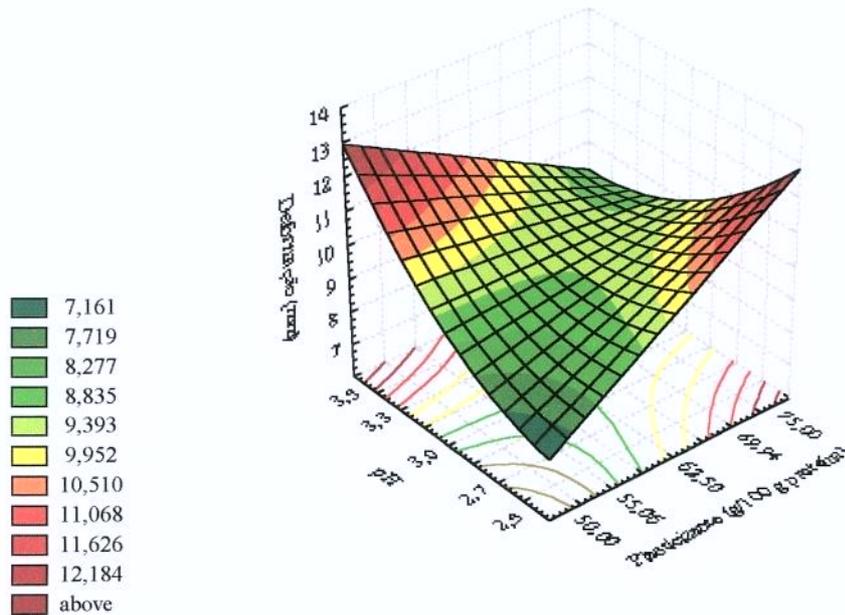


Figura 3.4 - Efeito combinado do pH e da concentração do plasticizante (C_g) na solução formadora de filme sobre a deformação na ruptura dos filmes. Com a concentração de proteína 1 %, mantendo a temperatura constante, $T=55\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2 SOLUBILIDADE

As solubilidades médias medidas nos filmes estão apresentadas na Tabela (3.9). Nota-se que o maior valor de solubilidade observado foi de 27,65 % (ensaio n^o 09: $C_g=50\%$, $\text{pH}=3,0$ e $T=55\text{ }^\circ\text{C}$), enquanto que o menor valor alcançado foi de 2,42 % (ensaio n^o 14: $C_g=62,5\%$, $\text{pH}=3,0$ e $T=75\text{ }^\circ\text{C}$). Estes resultados são inversos aos mencionados na literatura, onde biofilmes com maior concentração de plasticizante apresentam maior solubilidade.

No Anexo (A) se apresentam os dados estatísticos completos. Na Tabela (3.9) estão apresentados os efeitos estatisticamente significativos ($p>0,20$), das variáveis concentração de plasticizante (C_g), pH e temperatura (T) sobre a solubilidade dos filmes. Observa-se pelos valores da Tabela (3.9) que todos os fatores provocaram diminuição da solubilidade, e dentre eles destaca-se a temperatura. Verifica-se uma diminuição da solubilidade, em média, de 6,54 quando a temperatura passa de seu nível inferior $35\text{ }^\circ\text{C}$ para seu nível superior $70\text{ }^\circ\text{C}$. Na Tabela (3.10) estão apresentados os coeficientes significativos ($p>0,10$)

do modelo estatístico adotado. A Equação (3.4) mostra o modelo de solubilidade em função dos parâmetros estudados Cg, pH e T.

Tabela 3.9 – Efeito dos fatores sobre a solubilidade calculados para o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2^{a} ordem.

Fator	Efeito (%)	Erro Padrão	P	
Linear	Média	25,05*	0,22*	0,000002*
	Cg	-4,18*	0,24	0,000420
	PH	-2,55*	0,24	0,001819
	T	-5,66*	0,24	0,000171
Interações	Cg x pH	-2,09*	0,31	0,007017
	Cg x T	2,02*	0,31	0,007675
	pH x T	-0,89**	0,31	0,065657
Quadráticos	Cg ²	-1,18*	0,25	0,018172
	PH ²	-6,55*	0,25	0,000124
	T ²	-11,18*	0,25	0,000025

Valores estatisticamente significativos: * p>95% e ** p>90% de confiança.

$$\text{Solubilidade} = 25,05 - 2,09Cg - 1,27pH - 2,83T - 1,04Cg.pH + 1,01Cg.T - 0,45pH.T - 0,59Cg^2 - 3,27pH^2 - 5,59T^2 \quad (3.4)$$

A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação (3.4) estão apresentados na Tabela (3.11). Verifica-se um coeficiente de correlação (0,94), e o F calculado (6,83), comparado ao $F_{(90\%,9,8)}$ tabelado (2,56) foi 2,6 vezes superior que o tabelado. Indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança. A partir do modelo obtido (Equação 3.4) pode-se gerar as superfícies de respostas em função das variáveis significativas.

Tabela 3.10 – Coeficientes de regressão calculados para a solubilidade utilizando o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2^{a} ordem.

Efeito		Coeficiente (%)	Erro Padrão	P
Linear	Média	25,05*	0,22*	0,000002*
	Cg	-2,09*	0,12	0,00042
	PH	-1,27*	0,12	0,000124
	T	-2,83*	0,12	0,000025
Interações	Cg x pH	-1,04*	0,15	0,007017
	Cg x T	1,01*	0,15	0,007675
	pH x T	-0,45**	0,15	0,065657
Quadráticos	Cg x Cg	-0,59*	0,12	0,018172
	pH x pH	-3,27*	0,12	0,000124
	T x T	-5,59*	0,12	0,000025

Valores estatisticamente significativos: * $p > 95\%$ e ** $p > 90\%$ de confiança.

Os resultados dos testes de solubilidade (Figura 3.5) permitem a visualização de uma solubilidade máxima, de aproximadamente 30 %, em função da temperatura em torno de 50 °C, e do pH entre 2,8 e 3,0. Em relação à influência da concentração de plasticizante, quando se analisa a solubilidade a um pH próximo de 3,0, pode-se observar uma tendência de ligeira redução da solubilidade com o aumento da concentração de plasticizante (Figura 3.6).

Tabela 3.11 - Análise de variância do ajuste de um modelo linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a solubilidade.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{Calculado}}$	F_{Tabelado}
Regressão	676,37	9	75,15	6,83	2,56
Resíduos	88,01	8	11		
Falta de Ajuste	87,41	5	17,48		
Erro Puro	0,60	3	0,10		
Total	764,38	17			

A solubilidade da proteína pode indicar a dispersão e a perda da integridade da matriz protéica, também serve como indicativo do grau de desnaturação da proteína. A solubilidade dos filmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina, em água, de modo geral apresentaram valores baixos (2 e 28%), comparados a outros valores reportados na literatura, vide Tabela (3.12).

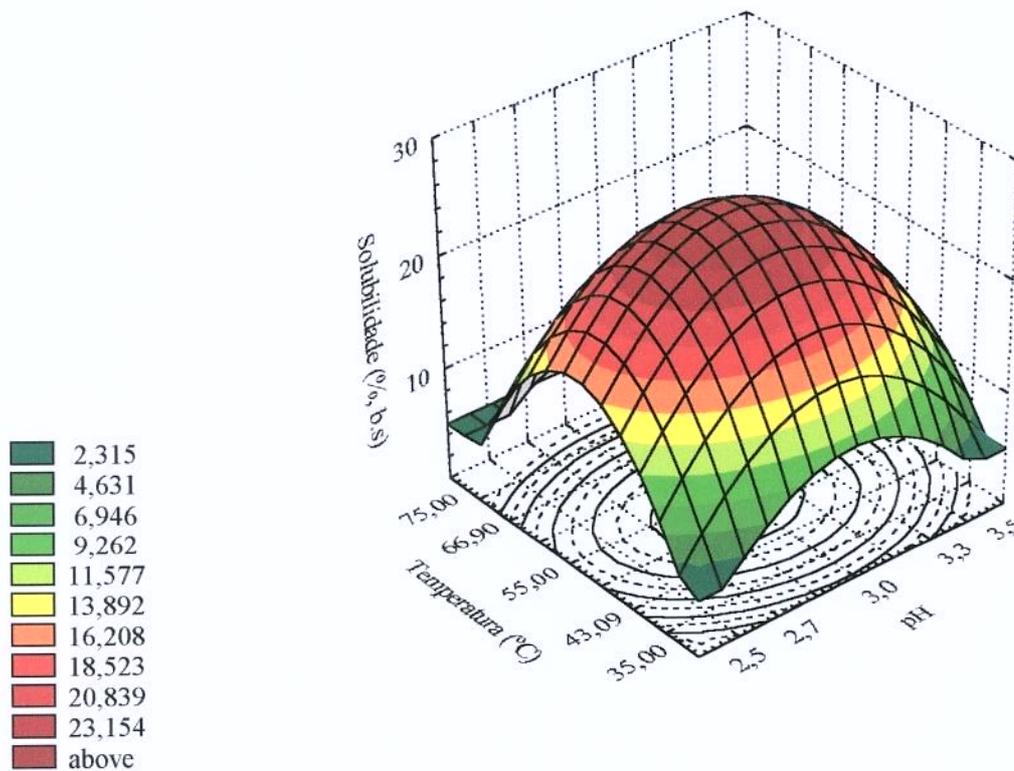


Figura 3.5 - Efeito combinado da temperatura e do pH sobre a solubilidade dos filmes com a concentração de proteína 1 %, mantendo a concentração de plasticizante constante em 62,5%.

A diferença de solubilidades entre os filmes a base de proteínas miofibrilares de peixe (sardinha do Atlântico) e bovina se deve provavelmente às diferenças entre espécies, processo de extração, estado *pré-rigor* e *post-rigor* em que foram extraídas e também a temperatura em que foi realizada a solução formadora de filme.

Tabela 3.12 – Comparação da solubilidade dos filmes.

Filme	Cg (g/100 g proteína)	pH	Solubilidade (%)	Autor
PM tilápia-do-Nilo ^a	30-70	3,0	12,3-19,5	1
Glúten+Glicerol	2,5-12,5	2-6	31,5-100	2
PM bovina ^b	50-75	2,8	2-28	3
Clara de ovo+PEG	60	10,5-11,5	44,9-50,9	4
PM Sardinha do Atlântico	35	3,0	33-47	5
WPI+PROPILENO GLICOL:G ^a	50	10	26-30	6
Proteína de soro de leite- D+G ^a	30:70	4-8	95	7
Proteína de soro de leite- N+G ^a	30:70	4-8	25	7
Albúmem de ovo	3:5	6-9	37-48	8

^aPM- Proteína miofibrilar; WPI+propilenoglicol:G- Isolado protéico de soro: glicerol; PEG: polietileno glicol; D: desnaturada; G: glicerol; N: natural.

¹MONTERREY (1998); ²GONTARD (1991); ³Estudo; ⁴HANDA et al. (1999); ⁵CUQ (1996); ⁶RHIM et al. (1999); ⁷PÉREZ-GAGO et al. (1999); ⁸JANGCHUD & CHINNAN, (1999).

Do ponto de vista industrial a baixa solubilidade dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de músculo bovino permite visualizar um grande potencial de aplicação em alimentos com alto teor de umidade. A permanência da integridade do filme permite sugerir que a matriz protéica do filme não foi totalmente desestabilizada, ou seja, as interações moleculares intra e intercadeias permaneceram praticamente intactas e que somente monômeros, pequenos peptídeos, substâncias não protéicas e pequena quantidade de plasticizante foram solubilizados.

A Figura (3.7) mostra duas condições de solubilidade dos filmes: as solubilidades experimentais (50 e 75% de plasticizante glicerol), medidas dos biofilmes e as solubilidades calculadas como se todo glicerol adicionado ao biofilme fosse solubilizado.

Nota-se que as solubilidades experimentais dos filmes estão abaixo das solubilidades calculadas para o glicerol. Pode-se assegurar, portanto que houve interações entre as moléculas de glicerol e a matriz protéica. A molécula de glicerol pode ajustar-se no interior da cadeia protéica e se estabilizar por pontes de hidrogênio com grupos reativos de aminoácidos não ionizáveis polares da proteína.

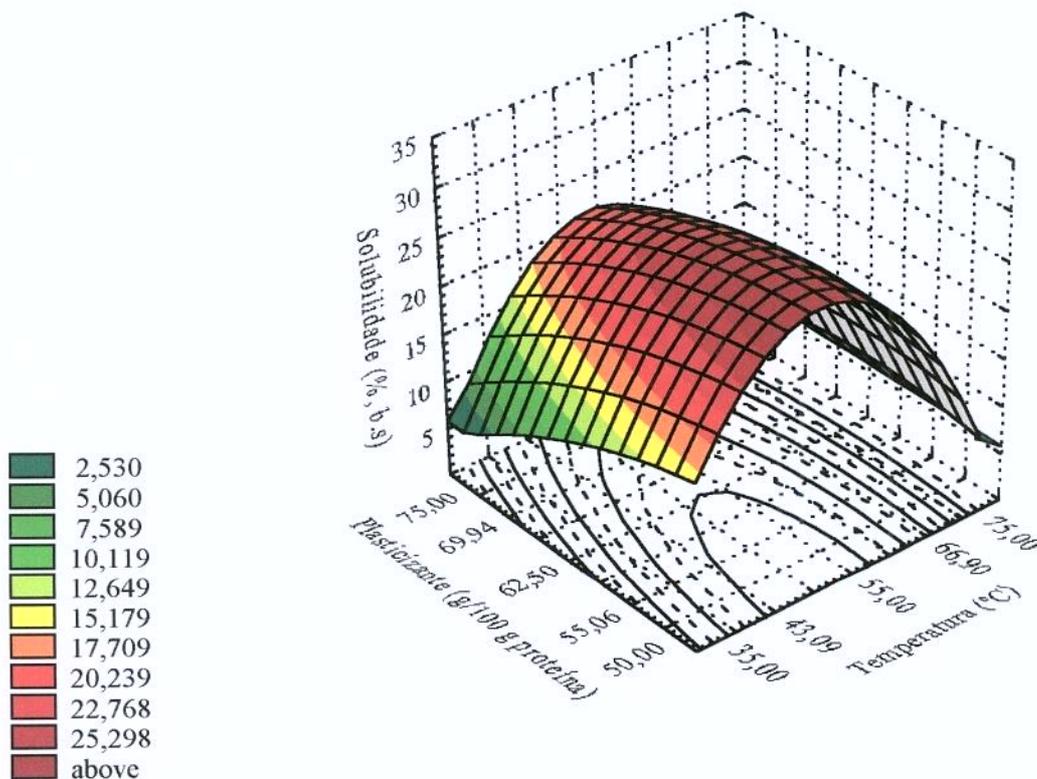


Figura 3.6 - Efeito combinado da temperatura e da concentração de plasticizante sobre a solubilidade dos filmes com a concentração de proteína 1 %, mantendo o pH constante em 3,0.

Outra explicação, também mencionada por CUQ et al. (1997) sugere que a substituição de uma dupla ponte de hidrogênio ($85 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre dois grupos amino, por uma ponte de hidrogênio ($25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre um grupo amino e uma molécula de plasticizante é favorável, pois decresce a energia necessária de interação. Conseqüentemente, a provável interação entre o glicerol e a proteína torna o plasticizante indisponível para reagir com as moléculas de água.

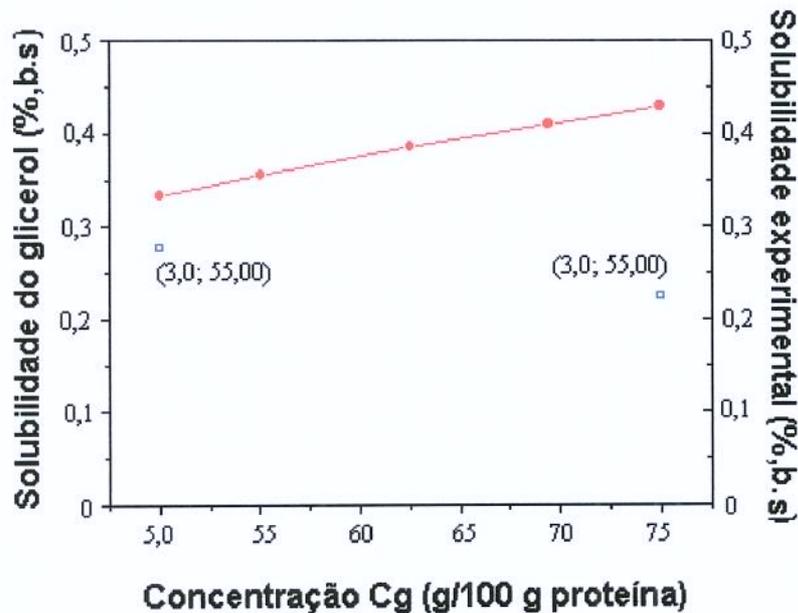


Figura 3.7 – Efeito da concentração de glicerol na solubilidade em água dos biofilmes. Legenda : - ● -, glicerol solúvel; - □ -, solubilidade experimental e (pH; T) = (3,0; 55).

3.3 OPACIDADE

A opacidade foi obtida integrando-se a área sob a curva de absorvância versus comprimento de onda. O menor valor observado de opacidade foi 81,96%, na Tabela (3.2) que corresponde ao ensaio n^o 01: Cg=55,06; pH=2,7 e T=43,09 °C, e a opacidade de maior valor (187,40 Ua.nm) foi encontrado no ensaio n^o 03: Cg=55,06; pH=3,3 e T=43,09 °C.

No Anexo (A) se apresentam os dados estatísticos completos. Os fatores estatisticamente significativos estão apresentados na Tabela (3.13). Observam-se os efeitos das variáveis concentração de plasticizante (Cg) e o pH sobre a opacidade dos filmes. Verifica-se um aumento da opacidade, em média, de 19,40 Ua.nm quando a concentração de plasticizante passa de seu nível inferior 55% para seu nível superior 70%. Ao aumentar o pH de 2,7 até 3,3, a opacidade também aumenta 25,20 Ua.nm, em média. Na Tabela (3.14) estão apresentados os coeficientes de regressão significativos ($p > 0,10$) do modelo estatístico adotado. A Equação (3.5) mostra o modelo de opacidade em função dos parâmetros estudados Cg e pH.

Tabela 3.13 – Efeito dos fatores sobre a opacidade calculados para o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Fator		Efeito (Ua.nm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	125,34*	7,72	0,000509
	PH	50,40*	13,37	0,032659
Quadráticos	Cg x Cg	38,80**	13,37	0,062470

Valores estatisticamente significativos: * p>95% e ** p>90% de confiança.

$$\text{Opacidade} = 125 + 19,40Cg^2 + 25,20pH \quad (3.5)$$

A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação (3.5) estão apresentados na Tabela (3.15).

Tabela 3.14 – Coeficientes de regressão calculados para a opacidade utilizando o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Efeito		Coeficiente (Ua.nm)	Erro Padrão	P
Linear	Média	125,34*	7,72	0,000509
	PH	25,20*	6,68	0,032659
Quadráticos	Cg x Cg	19,40**	6,68	0,06247

Valores estatisticamente significativos: * p>95% e ** p>90% de confiança.

Verifica-se um coeficiente de correlação (0,94), e o F calculado (6,83), comparado ao $F_{(90\%,2,15)}$ tabelado (2,7) foi 6,1 vezes superior que o tabelado. Indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança. A partir do modelo obtido (Equação 3.5) pode-se gerar as superfícies de respostas em função das variáveis significativas.

Tabela 3.15 - Análise de variância do ajuste de um modelo linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a solubilidade.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{Calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	676,37	2	338,17	6,83	2,56
Resíduos	88,01	15	11		
Falta de Ajuste	87,41	12	17,48		
Erro Puro	0,60	3	0,10		
Total	764,38	17			

Na Figura (3.8) se apresenta a opacidade em função da concentração de plasticizante e pH. Observa-se uma queda acentuada da opacidade com o pH, e um leve decréscimo com a concentração de plasticizante. Além disso, estes valores menores de opacidade que correspondem a pH extremo devem ser descartados devido a sua acidez estar abaixo da máxima suportada pelo paladar e também por apresentar baixa resistência mecânica. As opacidades dos filmes a base de proteínas miofibrilares bovina, em geral, foram baixas. Entretanto, os valores encontrados foram superiores aos resultados obtidos em filmes a base de proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico (CUQ et al., 1995) e de Tilápia do Nilo (MONTERREY, 1998), porém inferiores aos de filmes a base de glúten de trigo, com opacidade aproximada de 250 Ua.nm (GONTARD, 1991). A causa provável das diferentes opacidades entre os filmes a base de proteínas de peixe e de carne bovina, deve-se principalmente ao tipo de músculo: branco e vermelho, respectivamente, ao estado em que as proteínas miofibrilares foram extraídas e também as condições de processamento dos filmes.

Na Figura (3.8) observa-se que o pH tem uma maior influência, em relação ao plasticizante e nota-se um aumento da opacidade à medida que o pH (3,3) da solução formadora de filme aproxima-se do ponto isoelétrico da proteína, por outro lado, a opacidade diminui ao aproximar-se do pH 2,5. A diminuição da opacidade dos filmes deve-se à desnaturação parcial com uma provável mudança na estrutura protéica e alterações de

cargas ao longo das cadeias laterais na molécula de proteína, bem como os resíduos, facilitando maior interação com o plasticizante.

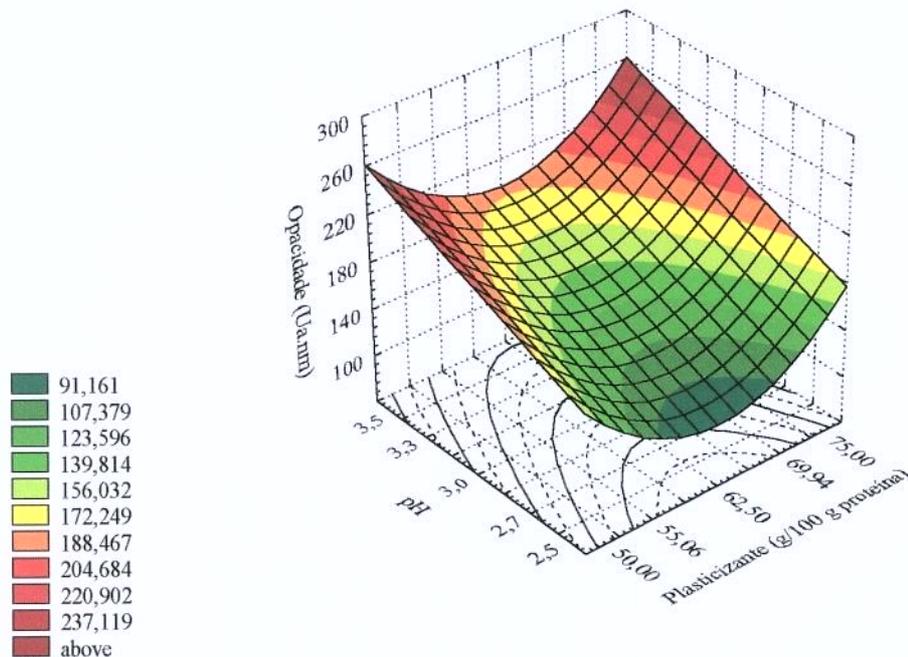


Figura 3.8 – Efeito combinado do pH e da concentração do plasticizante na solução formadora de filme, sobre a opacidade dos filmes com a concentração de proteína 1%, mantendo a temperatura constante em 55 °C.

Proteínas de soja quando submetidas a baixo pH e a temperatura alta, no processo de formação de biofilmes, também apresentaram uma desnaturação parcial com concomitante modificação na estrutura protéica (STUCHELL & KROCHTA, 1994). A provável causa do aumento da opacidade ao aproximar do ponto isoelétrico da proteína, deve-se à tendência da molécula em aglomerar-se e tornar-se menos solúvel, tornando difícil a fixação da molécula de glicerol no interior da matriz, contribuindo para o aumento da opacidade.

3.4 COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA

O coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculado a partir da Equação (1.2) do **Cap.1**, que se encontra desenvolvida no Anexo (B). Para todos os valores

encontrados da relação g/t, foi observado $R^2 > 0,98$. Na Tabela (3.2), se observa o menor valor médio de PVA ($1,70 \cdot 10^{-10}$ mol.m/s.m².Pa) no ensaio nº 15). Coincidentemente este valor é o resultado esperado do ensaio pelo modelo superfície-resposta, que corresponde ao valor médio dos pontos centrais (ensaio nº 15, 16, 17 e 18: Cg=62,50; pH=3,0 e T=55,00 °C). Enquanto o maior valor de PVA ($4,17 \cdot 10^{-10}$ mol.m/s.m².Pa) foi encontrado no ensaio nº 02: Cg=69,94; pH=2,7 e T=43,09 °C.

No Anexo (A) se apresentam os dados estatísticos completos. Os efeitos dos fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), de plasticizante (Cg), pH e a temperatura (T) sobre o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA) medido nos filmes estão apresentados na Tabela (3.16). Verifica-se uma diminuição do coeficiente PVA, em média, -0,55% quando eleva-se o pH de 2,7 até 3,3. Na Tabela (3.17) estão apresentados os coeficientes de regressão significativos ($p > 0,05$) do modelo estatístico adotado. A Equação (3.6) mostra o modelo de PVA em função dos parâmetros estudados Cg, pH e T.

Tabela 3.16 – Efeito dos fatores sobre a permeabilidade calculados para o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2ª ordem.

Fator		Efeito . 10^{-10} (mol*m/s*m ² *Pa)	Erro Padrão	p
Linear	Média	1,60*	0,09	0,000398
	pH	-0,55*	0,01	0,011493
Interações	Cg x T	-0,87*	0,13	0,006553
	pH x T	0,59*	0,13	0,01918
Quadráticos	Cg x Cg	0,47*	0,10	0,019042
	pH x pH	0,62*	0,10	0,009114
	T x T	0,75*	0,10	0,005212

Valores estatisticamente significativos a * $p > 95\%$ de confiança.

$$PVA = 1,60 - 0,27 pH - 0,43 Cg.T + 0,30 pH.T + 0,47 Cg^2 + 0,62 pH^2 + 0,75 T^2 \quad (3.6)$$

Onde o coeficiente *PVA* é a permeabilidade ao vapor de água. A análise de variância obtida pelo ajuste dos dados ao modelo da Equação (3.6) estão apresentados na Tabela (3.18). Verifica-se um coeficiente de correlação (0,87), e o F calculado (5,60), comparado ao $F_{(90\%,6,11)}$ tabelado (2,29) foi 2,3 vezes superior que o tabelado. Uma das prováveis causas da falta de ajuste do modelo deve-se a falta de homogeneidade dos filmes juntamente com a metodologia empregada para a medida do coeficiente de permeabilidade. A partir do modelo obtido (Equação 3.8) pode-se gerar as superfícies de respostas em função das variáveis significativas.

Tabela 3.17 – Coeficientes de regressão calculados para a permeabilidade utilizando o planejamento completo 2^3 de um polinômio de 2^a ordem.

Efeito		Coeficiente $\cdot 10^{-10}$ (mol*m/s*m ² *Pa)	Erro Padrão	p
Linear	Média	1,60*	0,09	0,000398
	pH	-0,27*	0,05	0,011493
Interações	Cg x T	-0,43*	0,06	0,006553
	pH x T	0,30*	0,06	0,01918
Quadráticos	Cg x Cg	0,24*	0,10	0,019042
	PH x pH	0,62*	0,10	0,009114
	T x T	0,37*	0,10	0,005212

Valores estatisticamente significativos a * $p > 95\%$ de confiança.

Ao observar a Figura (3.9) verifica-se um aumento da permeabilidade tanto para valores reduzidos, como para elevados de plasticizante e de pH. Esse aumento da permeabilidade provavelmente está relacionado com a abertura da macromolécula e a entrada facilitada das moléculas de glicerol na rede protéica, que posteriormente provoca uma fácil difusão das moléculas de água (STUCHELL & KROCHTA, 1994; McHUGH et al., 1994 e PARK et al., 1993). Um coeficiente de permeabilidade mínimo é obtido para a concentração de plasticizante aproximado de 60% e pH 3,1.

Tabela 3.18 - Análise de variância do ajuste de um modelo linear obtido pelo método dos mínimos quadrados para a permeabilidade.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{Calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	5,95	6	0,99	5,59	2,39
Resíduos	1,95	11	0,17		
Falta de Ajuste	1,85	8	0,23		
Erro Puro	0,1	3	0,03		
Total	7,9	17			

Na Figura (3.10), pode-se observar a interação entre o pH e a temperatura, sobre o coeficiente de permeabilidade permeabilidade. Como esperado, um aumento da temperatura de tratamento térmico, a partir de 50 °C, produz um acréscimo visível na permeabilidade quando o pH é da ordem de 3,6, porém o efeito é diverso a pH mais baixo.

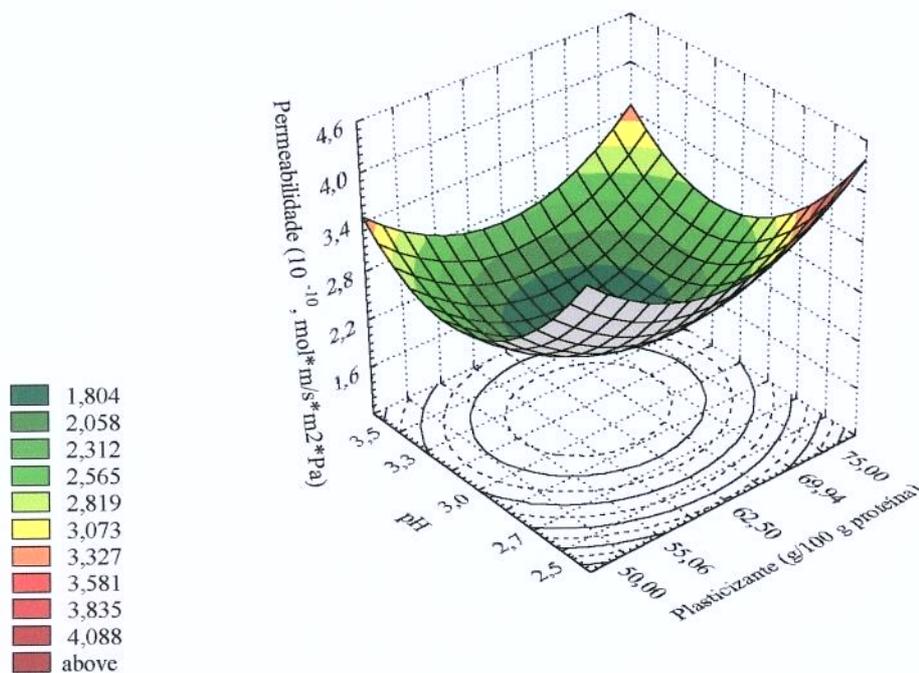


Figura 3.9 – Efeito combinado da concentração do plasticizante e do pH na solução formadora de filme sobre a permeabilidade dos filmes com a concentração de proteína 1 %, mantendo a temperatura constante, T=50 °C.

Ao comparar os valores de permeabilidade, obtidos em pH aproximado a 3,6, verificamos que são bem menores aos valores determinados em pH 2,5. Essa diferença é atribuída aos diferentes efeitos provocados pelo pH na macromolécula. Quando o pH está próximo de 3,6 tem-se uma maior solubilidade das proteínas, a estrutura protéica permanece intacta, até aproximadamente 50 °C, mas para temperaturas mais elevadas há modificações na estrutura protéica. A pH 2,5 ocorre desnaturação da macromolécula, tais como, a desnaturação das moléculas de miosina e subunidades próximas de 50 °C e da actina (actomiosina e fragmentos de actina) (SOBRAL et al., 1997).

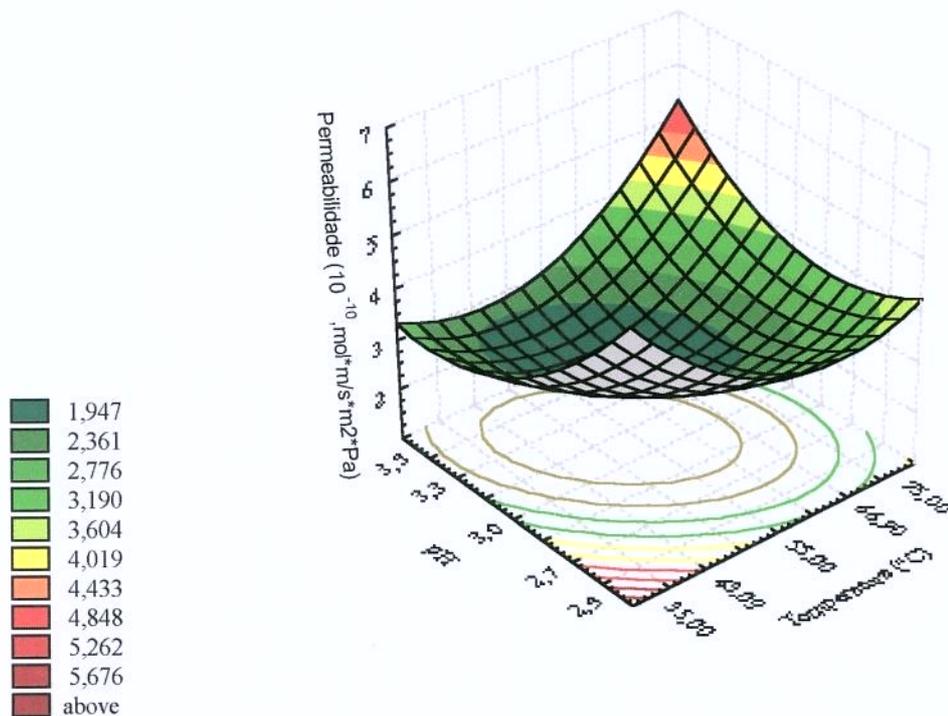


Figura 3.10 – Efeito combinado da temperatura e do pH na solução formadora de filme sobre a permeabilidade dos filmes com a concentração de proteína 1 %, mantendo a concentração do plasticizante constante, $C_g=62,5\%$.

Na Figura (3.11) como esperado, o aumento da concentração de plasticizante e da temperatura envolve um aumento da permeabilidade. Ao elevar a temperatura da solução formadora de filme, favorece uma maior incorporação de plasticizante devido a abertura da

cadeia de proteína, cuja estrutura e organização molecular modifica, com consequente aumento do volume livre que diminui a densidade de interações, tornando a rede mais frouxa, e mais solúvel devido o aumento de grupos hidrofílicos expostos que irão interagir com a molécula de glicerol, intensificando a afinidade pela água e aumentando a permeabilidade ao vapor de água (McHUGH et al., 1994; CHERIAN et al., 1995; CUQ et al., 1997; OCUNO & SOBRAL, 1998).

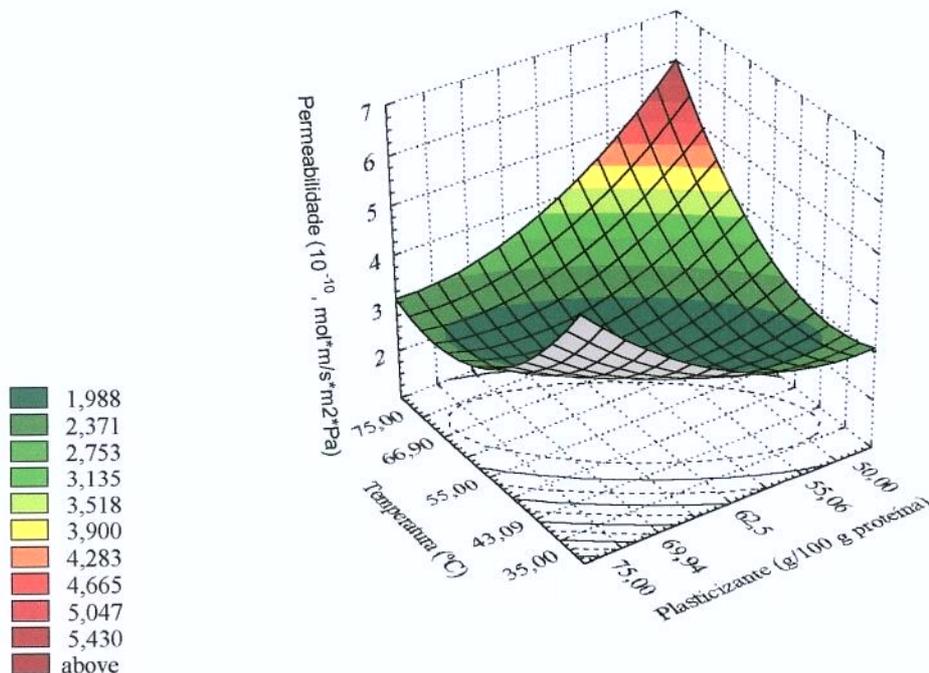


Figura 3.11 – Efeito combinado da temperatura e da concentração do plasticizante na solução formadora de filme sobre a permeabilidade dos filmes com a concentração de proteína 1 %, mantendo o pH constante em 3,0.

Na Figura (3.11), observa-se a interdependência da temperatura com o plasticizante sobre o coeficiente PVA. A região de mínimo mostra este efeito independente da temperatura e do plasticizante, com o pH constante em 3,0, sobre a permeabilidade. A facilidade de adsorção das moléculas de água na rede protéica dos filmes é igualmente facilitada pela afinidade pelo plasticizante (STUCHELL & KROCHTA, 1994; McHUGH et al., 1994; PARK et al., 1993).

3.5 FORMULAÇÃO OTIMIZADA

Este estudo permitiu encontrar uma formulação otimizada do filme, a base de proteínas miofibrilares extraídas de músculo bovino, utilizando a metodologia Superfície e Resposta. O método consiste de um planejamento experimental completo (2^3), que tem a característica de analisar os efeitos de diversos fatores simultaneamente. Neste trabalho os fatores otimizados foram: concentração de plasticizante (Cg), pH e Temperatura em função das propriedades mecânicas força-deformação na ruptura, solubilidade, opacidade e permeabilidade ao vapor de água. Apesar do modelo não ter um bom ajuste com as variáveis opacidade e permeabilidade, foi viável verificar as tendências destas variáveis. Desse modo foi possível encontrar os valores ótimos dos fatores estudados (Cg=60 %, g glicerol/g proteína, pH=2,8 e temperatura=50 °C). No Capítulo 4 discutir-se-á com mais profundidade as condições nas quais se obtém a formulação otimizada.

4. CONCLUSÃO

A solução formadora de filme apresentou características apreciáveis como sua homogeneidade e transparência, obtendo filmes de aparência visual considerável e de fácil manuseio.

Pode-se concluir que os efeitos do pH e da temperatura sobre propriedades funcionais de filmes a base de proteínas miofibrilares são complexos e implicam em alterações estruturais importantes, que favorecem a resistência mecânica dos filmes, sem comprometer a solubilidade e a opacidade dos filmes.

A baixa solubilidade dos biofilmes reforça a indicação de uma mínima desnaturação das proteínas miofibrilares.

De modo geral, os filmes produzidos a partir de proteínas miofibrilares parecem promissores considerando as suas propriedades mecânicas que indicam boas propriedades elásticas. O pH seguido da concentração do plasticizante e do tratamento térmico foi o principal fator que influenciou a solução formadora de filme.

5. BIBLIOGRAFIA

- ACTON, J.C.; HANNA, M.A.; SATTERLEE, L.D. Heat-induced gelation and protein-protein interaction of actomyosin. **Journal of Food Biochemistry**. v.5, n.2, p.101-113, 1981.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, 1988, 1990.
- BANKER, G.S. Film coating theory and practice. **Journal Pharmaceutical**. v.55, p.81-89, 1966.
- BARROS NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas. Ed. UNICAMP, 1996. 299p.
- BIQUET, B.; LABUZA, T.P. Evaluation of the moisture permeability characteristics of chocolate films as an edible moisture barrier. **Journal of Food Science**. v.53, n.4, p.989-997, jul./ago. 1998.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, S.W.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. Wiley-Interscience, 1978.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones**. Zaragoza:Acribia, 1989. P.346.
- CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol. **Cereal Chemistry**. v.72, n.1, p.1-6, 1995.
- CUQ, B. **Mise en forme et caractérisation de biomatériaux à base de protéines myofibrillaires**. Montpellier: Université Montpellier II, 1996. 213p. (Tese, Doctourado em Biochimie et technologies Alimentaires).
- CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**. v.60, n.6, p.1369-1374, nov./dez. 1995.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**. v.61, n.3, p.580-584, maio/jun. 1996.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.;GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.45, n.3, p.622-626, 1997.

- DANIELS, R. **Edible coatings and soluble packaging**. New Jersey: Noyes, 1973. p.346.
- EISELE, T.A.; BREKKE, C.J. Chemical and modification and functional properties of acylated beef heart myofibrillar proteins. **Journal of Food Science**. v.46, n.4, p.1095-1102, jul./ago. 1981.
- FOEGEDING, E.A. Thermally induced changes in muscle proteins. **Food Technology**. v.42, n.6, p.58-62, jun. 1988.
- GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. Montpellier, 1991. 174p. Tese (Doctourado en Sciences des Aliments) - Université Montpellier II, Academie de Montpellier.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**. v.30, n.1, p.3-15, jan./jun. 1996.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**. v.57, n.1, p.190-199, jan./fev. 1992.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glicerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**. v.58, n.1, p.206-211, jan./fev. 1993.
- GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**. v.29, n.1, p.39-50, jan./fev. 1994.
- GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: Mathlouthi M. ed. **Food packaging and preservation**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p.371-395.
- HANDA, A.; GENNADIOS, A.; FRONING, G.W.; KURODA, N.; HANNA, M.A. Tensile, solubility, and electrophoretic properties of egg white films as affected by surface sulfhydryl groups. **Journal of Food Science**. v.64, n.1, p.82-85, jan./fev. 1999.
- JANGCHUD, A.; CHINNAN, M.S. Peanut film as affected by drying temperature and pH of film forming solution. **Journal of Food Science**. v.64, n.1, p.153-157, jan./fev. 1999.
- KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films an coatings: a review. **Food Technology**. v.40, n.12, p.47-59, dez. 1986.
- LAMBALLERIE, M.; CHRAITI, F.; CULIOLI, J.; OUALI, A. Gélification de protéines myofibrillaires bovines. **Sciences des Aliments**. v.13, n.2, p.237-247, jun. 1993.

- 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 e 423, mar./abr. 1994.
- McHUGH, T. H.; KROCHTA, J.M. Sorbitol- vs glicerol-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, abr. 1994.
- MAHMMOUD, R.; SAVELLO, P.A. Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. **Journal of Dairy Science**. v.75, n.4, p.942-946, abr. 1992.
- MAHMMOUD, R.; SAVELLO, P.A. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. **Journal of Dairy Science**. v.76, n.1, p.29-35, jan. 1993.
- MONTERREY-Q, E.S. Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 1998. 83p.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, n.1, p.179-189, jan. 2000.
- OSAWA, R.; WALSH, T.P. Effects of acidic and alkaline treatments on tannic acid and its binding property to protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.41, n.5, p.704-707, maio. 1993.
- OCUNO, D.; SOBRAL, P.J.A. Preparo de proteínas miofibrilares de carne e elaboração de biofilmes com dois tipos de ácidos: propriedades mecânicas. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.1, n.1 e 2, p.44-52, jan/dez. 1998.
- PARK, H.J.; CHINNAN, M.S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**. v.25, p.497-507, 1995.
- PARK, H.J.; WELLER, C.L.; VERGANO, P.J.; TESTIN, R.F. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. **Journal of Food Science**. v.58, n.6, p.1361-1364 e 1370, nov./dez. 1993.
- PÉREZ-GAGO, M.B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability, solubility, and properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**. v.64, n.6, p.1034-1037, nov./dez. 1999.
- RHIM, J.W.; WU, Y.; WELLER, C.L.; SCHNEPF, M. Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. **Journal of Food science** v.64, n.1, jan./fev. 1999.

- SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; DE CARVALHO, R.A.; DE SOUZA, S.M.A.,
QUINTERO, E.S.M. Elaboração de filmes de proteínas para uso como
impermeabilizante ou embalagem flexível. In: Seminário Internacional: **Tópicos
Especiais em Ciência e Tecnologia de Proteínas**. ITAL. Campinas. p.95-104, nov.,
1997.
- STUCHELL, Y.M.; KROCHTA, J.M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible
soy protein films. **Journal of Food Science**. v.59, n.6, p.1332-1337, nov./dez. 1994.
- TEJADA, M. Gelation of myofibrillar fish proteins. **Revista española de Ciencia y
Tecnología de Alimentos**. v.34, n.3, p.257-273, jun. 1994.
- ZIEGLER, G.R.; ACTON, J.C. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue.
Food Technology. v.38, n.5, p.77-82, maio. 1984.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES: PROPRIEDADES

1. INTRODUÇÃO

Um dos processos mais amplamente utilizados na elaboração de biofilmes é o “casting”, que compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula e aditivo. A formulação geralmente contém pelo menos dois componentes, sendo um deles, o biopolímero (polissacarídeos ou proteínas) de alto peso molecular capaz de formar uma matriz contínua e coesa. O outro componente, quase sempre necessário em biofilmes a base de proteínas é o plasticizante, utilizado para melhorar a textura e facilitar o manuseio. A incorporação de plasticizantes em biopolímeros modifica a organização molecular tridimensional da rede protéica, diminuindo as forças de atração intermoleculares e aumentando o volume livre do sistema. A rede torna-se menos densa com o decréscimo das forças, melhorando a flexibilidade e extensibilidade dos filmes. O inconveniente é a afinidade do plasticizante pela água, que também é um plasticizante natural, sendo, portanto, um efeito negativo nas propriedades de barreiras do filme (CUQ et al., 1997). Vários são os plasticizantes utilizados na confecção de biofilmes, mas os polióis são os mais usados em combinação com polímeros hidrofílicos (McHUGH & CROCHTA, 1994; GONTARD, 1991; CUQ, 1996; CHERIAN et al., 1995), por ter propriedades favoráveis como efeito geométrico, peso molecular e afinidade com a proteína. Com adição do plasticizante o biofilme aumenta sua resistência à ruptura e à abrasão, permitindo uma boa proteção ao alimento, sem perder qualidade por manuseio, e a flexibilidade essencial para o filme se adaptar a eventuais deformações do alimento, sem danos mecânicos.

As propriedades mecânicas de interesse em biofilmes são a força e a deformação na ruptura (MONTERREY-Q & SOBRAL, 2000). Outro parâmetro que influencia as propriedades dos filmes é a sua espessura. Segundo GENNADIOS et al. (1993b), o controle da espessura é necessário para medir propriedades que são dependentes da uniformidade do filme e para obter comparação entre propriedades dependentes da espessura de diferentes filmes.

Os biofilmes a base de proteínas apresentam grande sensibilidade às condições ambientais, como umidade relativa e temperatura. Estudos de permeabilidade ao vapor de

água de filmes a base de proteínas miofibrilares de peixe, em função da espessura, foram realizados por CUQ et al. (1996). Observaram que as propriedades funcionais, tanto a permeabilidade como a força na ruptura, aumentaram linearmente com a espessura, enquanto a deformação teve um efeito contrário. O efeito da espessura sobre as propriedades funcionais, entre elas, propriedades mecânicas de força e deformação na ruptura, propriedades óticas (cor e opacidade) e de permeabilidade ao vapor de água foi avaliado por OCUNO & SOBRAL (1998) com biofilmes elaborados a base de dois tipos de gelatina, indicando que o controle da espessura é imprescindível para a caracterização de biofilmes, uma vez que a força na ruptura, a permeabilidade ao vapor de água e a cor do filmes foram fortemente influenciados pela espessura. Por outro lado, a deformação na ruptura e opacidade, praticamente não dependeu da espessura. Anteriormente, MAHMOUD & SVELLO (1992) relataram que a espessura dos biofilmes influencia as propriedades mecânicas (força e deformação na ruptura) e a permeabilidade ao vapor de água de filmes a base de zeína, glúten e derivados de celulose. PARK et al. (1993) estudaram os efeitos da espessura e concentração de plasticizante sobre a permeabilidade ao vapor de água e propriedades mecânicas de força e deformação na ruptura de filmes a base de metil celulose e hidroxipropil celulose. Os autores observaram que as propriedades funcionais de filmes de metil celulose tiveram menor influência da espessura do que os filmes de hidroxipropil celulose, sendo o último possuidor de maior número de grupos hidroxilas, devido ao grupo funcional hidroxipropil. BANKER (1966) mencionam que a permeabilidade ao vapor de água em encapsulados a base de celulose aumentava linearmente com a espessura do filme. De maneira geral, não existem dados sobre o efeito de aumento da espessura sobre a força e deformação na ruptura e à permeabilidade ao vapor de água de filmes a base de macromoléculas de diferentes hidrofílicidades, nem com filmes a base de proteínas miofibrilares bovina. Assim, são objetivos deste capítulo apresentar o estudo realizado da influência da espessura do filme e da umidade relativa ambiente sobre as propriedades mecânicas (força e deformação na ruptura) e permeabilidade ao vapor de água. Estas propriedades foram determinadas em filmes elaborados com proteínas miofibrilares de origem bovina utilizando a formulação e processo de elaboração otimizada, desenvolvida no **Cap. 3**.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE

Utilizou-se o músculo *Semitendinosus* de carne bovina no estado *pós-rigor*, adquirido em casa comercial local, pré-preparado e extraído de acordo com a metodologia descrita no item 2.1 do **Cap. 2**.

2.2 FORMAÇÃO DO FILME

A elaboração dos filmes, segundo o método “casting”, consistiu inicialmente na formação de uma solução coloidal, contendo 1% (g proteína/100 g solução) de proteínas miofibrilares de carne bovina (PMB) e 60% (g glicerol/g proteína) de plasticizante, com pH 2,8, mantido com ácido acético. A solução formadora de filme (SFF) foi preparada de maneira semelhante à descrita em 2.2 do **Cap.3**. A temperatura do tratamento térmico dado a SFF foi de 50 °C.

A SFF foi adicionada em placa, em volumes calculados de modo a obter filmes de espessuras, médias: 0,040, 0,060 e 0,080 mm ($\pm 0,005$ mm). O tempo de secagem foi variável, entre 18 e 26 h, para obter umidade constante para todas espessuras. A medida de espessura foi realizada com medidas em 15 posições diferentes com um micrômetro (Modelo Tesa, Suíça).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

Os biofilmes, após a secagem, foram condicionados em ambiente com umidade relativa (UR) controlada (75%), utilizando uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e temperatura de 25 °C, durante 48 h.

2.3.1 PROPRIEDADES MECÂNICAS - FORÇA E DEFORMAÇÃO NA RUPTURA

As propriedades mecânicas dos filmes foram estudadas utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Modelo Stable Micro Systems, Inglaterra) (GONTARD, 1991) para

determinar força e deformação na ruptura de acordo com o procedimento descrito em 2.4 do **Cap.3**. A força (F) na ruptura e o deslocamento (D) na ruptura foram determinados diretamente das curvas de força versus deformação plotados pelo “software” Texture Expert 1.15 (Stable Micro Systems). A deformação na ruptura ($\Delta l/l_0$) foi calculada a partir da Equação (4.1), que se encontra desenvolvida no Anexo E (GONTARD, 1991), sendo l_0 o comprimento inicial do filme, calculado como o raio da célula de medida (17 mm), e D é a distância penetrada pela sonda na ruptura.

$$\frac{\Delta l}{l_0} = \left(\frac{\sqrt{D^2 + l_0^2} - l_0}{l_0} \right) \cdot 100 \quad (4.1)$$

2.3.2 COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA

A determinação do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água foi conduzido utilizando-se o método padrão modificado ASTM E 96-80 (ASTM, 1990), de acordo com a metodologia descrita em 2.3. do **Cap.3**.

TABELA 4.1 - Umidades relativas de soluções salinas saturadas a 25 °C.

Sal	a_w
MgCl ₂	0,327
Mg(NO ₃)	0,536
NaNO ₂	0,645
NaCl	0,756
KCl	0,843

Fonte: ROOS (1995).

As amostras de filmes foram semelhantemente fixadas em células de permeação de vidro, contendo sílica gel no seu interior e colocadas em ambiente climatizado a 25 °C. As células de permeação foram em seguida, colocadas dentro de dessecadores contendo soluções salinas saturadas, com a a_w variando entre 0,070 e 0,907 (Tabela 4.1). Este procedimento foi realizado para as três espessuras do filme. No final dos testes de permeabilidade ao vapor de água, os teores de umidade das amostras foram determinados de acordo com a metodologia descrita no **Cap.3** item 2.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. FORMULAÇÃO ÓTIMA

O delineamento estatístico fatorial completo de dois níveis (2^3), na metodologia de superfície e resposta apresentado no **Cap.3**, permitiu estudar as variáveis consideradas principais influenciadoras no processo de elaboração dos biofilmes. A análise dos dados permitiu encontrar uma formulação otimizada. Em função do apresentado anteriormente foi possível a obtenção de biofilme a base de proteínas miofibrilares de origem bovina, biodegradável e auto sustentável, flexível, homogêneo, manuseável e não pegajoso ao tato. As condições da formulação otimizada foram 60% (g glicerol/g proteína seca) de plasticizante, pH 2,8 (mantido com ácido acético) e $T=50$ °C, com uma concentração protéica constante de 1% (g proteína/ 100 g solução).

Para avaliar a formulação ótima do filme foram considerados os seguintes aspectos: as propriedades mecânicas de força máxima e de deformação mínima, num valor de pH tal que a solubilidade da proteína na solução formadora do filme fosse máxima, utilizando uma menor quantidade de plasticizante.

A polimerização da proteína miofibrilar começa no abate do animal até extração da proteína, durante a formação e subsequente secagem do filme. A hipótese do mecanismo de formação do filme envolve primeiro as ligações dissulfídicas, desenvolvidas no estado pós-

rigor que se acentuam na etapa final da extração, com “salting-out” da molécula protéica, que favorece a formação de interações hidrofóbicas. Na solução formadora de filme (SFF), preferencialmente, ocorrem ligações do tipo pontes de hidrogênio. Ao reduzir o pH a 2,8 da SFF e submetê-la ao tratamento térmico há desnaturação parcial da cabeça da actomiosina, da estrutura α -hélice e ao longo da cadeia expondo os grupos (-SH) intramolecular e os hidrofóbicos, dispondo-os, com a abertura da rede para outras ligações. Ao adicionar plasticizante glicerol sua penetração no interior da rede protéica é facilitada por se tratar de uma molécula hidrofílica, de baixo peso molecular (92 g/mol), com 3 átomos de carbono e três grupos hidroxilas. Seu entrelaçamento na rede se dá por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas do plasticizante e grupos amins da proteína. O plasticizante ao entrar em contato com a proteína induz a formação de interações entre plasticizante-proteína em detrimento da interação proteína-proteína, ocasionando uma diminuição de interações intermoleculares, promovendo um aumento do volume livre entre cadeias (CUQ et al., 1997).

Na secagem ocorre a junção destes grupos sulfidrilas através da oxidação pelo ar de secagem. As ligações dissulfídicas (-S-S-) intra e intermoleculares voltam a ocorrer e, conseqüentemente em maior interligamento da rede protéica tridimensional, envolvendo as interações com o plasticizante. As proteínas, ao se ligarem com o plasticizante, reduzem a densidade de interações ao longo das cadeias laterais de proteínas e, conseqüentemente, aumentam o espaço livre intermolecular possibilitando maior movimento das cadeias, diminuindo as forças intermoleculares e fornando um filme de estrutura mais flexível (BANKER, 1966).

O biofilme produzido da formulação otimizada, de espessura igual a 0,040 ($\pm 0,005$ mm), a base de proteínas miofibrilares bovina está apresentado na Figura (4.1). A espessura média dos filmes foi de 0,040 mm \pm 0,008 resultado obtido de 15 medidas, 10 e 5, no sentido de maior e menor comprimento do filme, respectivamente.

Observa-se (Figura 4.1) uma variação de cor e também de transparência do filme sobre o disco colorido. Os tons de cores mais claros (branco, azul claro, rosa e amarelo) mascaram ligeiramente a transparência do filme. A cor do biofilme levemente amarelada

deve-se aos resíduos de pigmentos da carne vermelha (mioglobina) ainda remanescente na proteína, devido ao método de separação, bem como da sua modificação. Entretanto, o biofilme apresentou uma superfície ligeiramente arenosa e rugosa, devido a presença de substâncias insolúveis, mostrada no corte transversal, na microfotografia eletrônica de varredura (Figura 5.4abc).

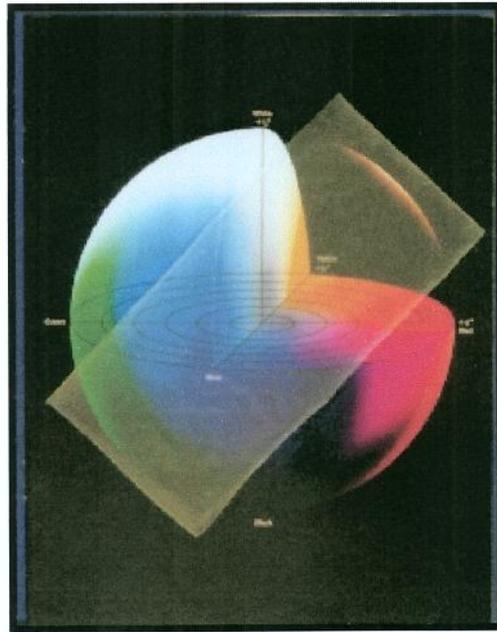


Figura 4.1 - Filme a base de proteínas miofibrilares de músculo *Semitendinosus* bovino pós-rigor. Formulação otimizada do biofilme ($C_p=1\%$, $C_g=60\%$, $pH=2,8$ e $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.1.1 EFEITO DA ESPESSURA SOBRE AS PROPRIEDADES MECÂNICAS

O comportamento da força na ruptura em função da umidade dos filmes, para diversas espessuras é apresentado na Figura (4.2), cujos dados são média de 5 repetições. Pode-se notar que o aumento da umidade do filme diminuiu gradativamente a força na ruptura, até um dado valor, que independe da espessura do filme. A força na ruptura é definida como o máximo de tensão que o filme pode sustentar. O valor de força na ruptura

é utilizado para caracterizar filmes de espessura fina, com defeitos difíceis de visualizar, e filmes que têm propriedade de tensão desproporcional à área em que é aplicada a força (ASTM, 1988).

A força de ruptura depende da espessura do filme, e portanto deve ser analisado em função da espessura. À medida que a espessura aumenta, a força de ruptura também aumenta, entretanto, não linearmente. Para um aumento de 40 a 80 μm , a umidade relativa de 20 %, a força de ruptura aumenta de 30,08 a 54,71 Mpa. Desta forma, para um acréscimo de 100% na espessura a força de ruptura aumenta 78%. Mais ainda, os valores da força de ruptura tendem ao mesmo valor nos filmes de umidade alta 32,10 (% b.u).

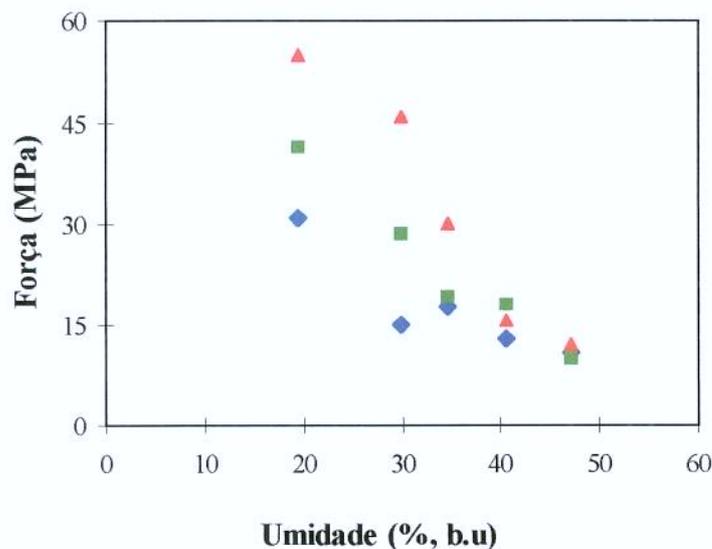


Figura 4.2 - Efeito da umidade sobre a força na ruptura do biofilme, formulação otimizada ($C_p=1\%$, $C_g=60\%$, $\text{pH}=2,8$ e $T=50\text{ }^\circ\text{C}$). Produzidos com diferentes espessuras: 80 μm , -▲-; 60 μm , -■-; 40 μm , -◆-.

Segundo CUQ et al. (1996), em filmes a base de proteínas miofibrilares de sardinha do atlântico ($\text{UR}=58\%$ e $T=20\text{ }^\circ\text{C}$), a força na ruptura apresenta um comportamento linear com a espessura entre 0,010 e 0,055 mm.

Com o aumento da espessura, tem-se uma quantidade maior de matéria seca depositada por unidade de área, elevando-se o número de cadeias de proteína e de interações por unidade de área. No entanto, os valores de força tendem a ser semelhantes, quando a umidade do filme atinge valores acima de 35% (% b.u), para filmes de espessuras (40 e 60 μ m). Isto sugere dizer que o aumento da umidade dá origem a interações semelhantes, e de menor energia ao longo de toda espessura. A adsorção de moléculas de água é favorecida dentro da rede protéica, e aumenta com adição de glicerol.

Estas modificações da rede protéica em relação à espessura e umidade relativa têm um efeito inverso na % de deformação. A deformação na ruptura também é influenciada pela espessura e umidade relativa em que as amostras foram condicionadas (Figura 4.3). No gráfico, verifica-se no filme de espessura (40 μ m), o aumento da deformação de $\pm 7\%$ para $\pm 13\%$, ao elevar-se a umidade de 20 a 48% (% b.u), enquanto, nos filmes de maiores espessuras (60 e 80 μ), nota-se uma variação semelhante na faixa de 6 a 11% na deformação, ao elevar-se a umidade de 20 a 48% (% b.u).

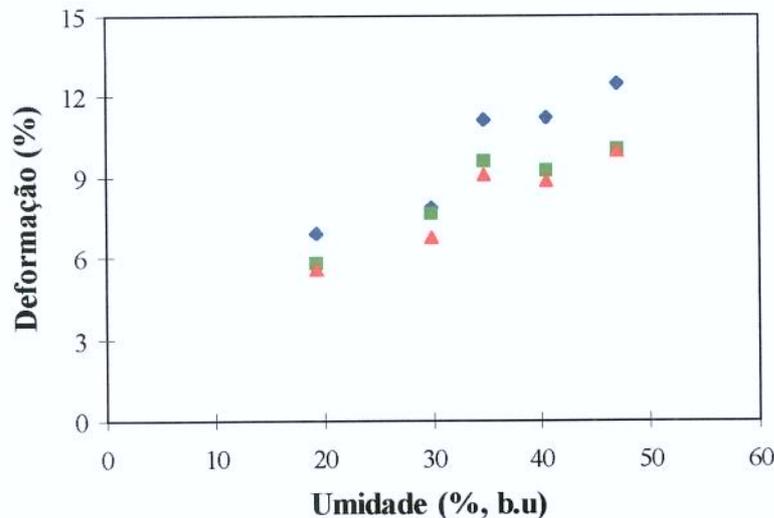


Figura 4.3 - Efeito da umidade sobre a deformação na ruptura do biofilme, formulação otimizada ($C_p=1\%$, $C_g=60\%$, $pH=2,8$ e $T=50^{\circ}C$). Produzidos com diferentes espessuras: 80 μ m, - \blacktriangle -; 60 μ m, - \blacksquare -; 40 μ m, - \blacklozenge -.

É interessante comparar os valores obtidos de força e deformação na ruptura, com os obtidos por outros autores (Tabela 4.2) na mesma faixa de temperatura e umidade.

Tabela 4.2 - Propriedades mecânicas, força na ruptura e deformação, de biofilmes a base de proteínas miofibrilares bovina comparada a outros filmes comestíveis e/ou biodegradáveis e filmes sintéticos.

Filme	T (°C)- UR (%)	Espessura (μm)	Força (MPa)	Deformação (%)
PM tilápia-do-Nilo ^a	22 - 58	37 - 54	31,10	6,45
WG ^a	25 - 56	50	27,14	
PM bovina ^b	23 - 75	40	20,50	11,20
HPC ^a	25 - 75	54	17,60	
PM Sardinha do Atlântico	25 - 57	34	17,10	22,70
WPI:G ^a	23 - 50	110	13,90	30,80
RB9,5 ^a	23 - 55	190	11,80	
GGs (15:4:2) ^a	25 - 50	87	5,60	39,00
Albúmem de ovo	23 - 50	99	1,26	32,20
Zeína de milho	26 - 50	81	0,40	

^aPM- Proteína miofibrilar; WG- Glúten de trigo; HPC- Hidroxipropilcelulose; WPI:G- Isolado protéico de soro: glicerol; RB9,5: Farelo de arroz pH9,5; GGS: Glúten-glicerina-sacarose.

^b Este estudo.

Observa-se em biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina, 40μm a 25 °C; e 75%UR, que a porcentagem de deformação (11,20%) é substancialmente menor em relação a todos os filmes apresentados na Tabela (4.2), exceto para biofilmes a base de proteínas miofibrilares de peixe (tilápia do Nilo), onde a deformação do filme apresentou um menor valor (6,45%), nas condições (T=22 °C; UR=58% e espessura variando de 37 a 54μm). Também se verifica que a força de ruptura é maior que a dos diversos filmes comparados, à exceção da mencionada anteriormente (proteínas miofibrilares de peixe - tilápia-do-Nilo). Portanto, podemos concluir que estes filmes são ligeiramente mais rígidos e resistentes.

3.1.2 EFEITOS DA ESPESSURA SOBRE O COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA

A influência da espessura e ambiente de condicionamento sobre o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (PVA), média entre triplicatas, dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares bovina, pode ser observada na Figura (4.4). Os resultados de ganho de peso das células de medidas (dados não mostrados), para os biofilmes, nas condições acima citadas, tiveram comportamento linear positivo acima de 99%, para todas as amostras. A partir do ajuste linear das curvas foi obtido o termo (g/t) da Equação (1.2) do **Cap.1**, correspondente a inclinação da reta ($Y = a + bx$).

Na Figura (4.4) observa-se que a PVA dos biofilmes aumenta com a hidratação do filme, em todas espessuras (40, 60 e 80 μ m). Nota-se na figura dois grupos de pontos experimentais: uma zona de inclinação maior, correspondendo a faixa de umidade abaixo de 30% (b.u), e outra, onde a taxa de aumento da PVA é menor, para as umidade acima de 30% (b.u), ocorrendo uma diminuição gradativa das inclinações até atingir valores constantes, da ordem de $1,15 \cdot 10^{-11}$, $1,28 \cdot 10^{-11}$ e $1,47 \cdot 10^{-11}$ mol.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹, para as espessuras 40, 60 e 80 μ m, respectivamente.

Para umidades relativas acima de 30% este comportamento também foi observado por McHUGH et al. (1993); CUQ et al. (1996) e PARK et al. (1993). Como esperado o aumento da umidade em filmes comestíveis, de natureza hidrofílica, provocou um aumento da PVA (BIQUET & LABUZA, 1988; GONTARD et al., 1993). Segundo estes autores, a água mostrou efeito plasticizante em filmes a base de chocolate e proteínas de glúten de trigo, respectivamente. Neste trabalho, o filme de espessura 40 μ m aumentou a PVA de $2,4 \cdot 10^{-12}$ a $1,15 \cdot 10^{-11}$ mol.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹, ao elevar a umidade de 7,8 a 32,10% (g água/100 g amostra), a PVA do filme aumentou 3 vezes, enquanto para o filme de espessura, 80 μ m, o efeito provocado pela elevação da umidade foi mais acentuado (10 vezes), que para o filme de espessura intermediária, 60 μ m, (5 vezes).

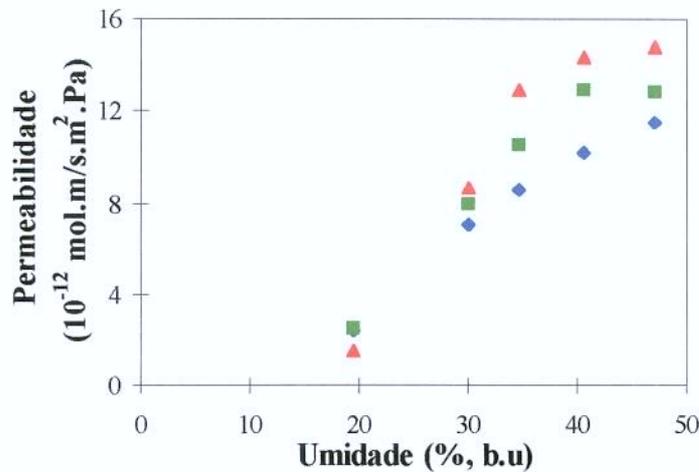


Figura 4.4 - Efeito da umidade sobre a permeabilidade ao vapor de água do biofilme, formulação otimizada ($C_p=1\%$, $C_g=60\%$, $pH=2,8$ e $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Produzidos com diferentes $80\text{ }\mu\text{m}$, -▲-; $60\text{ }\mu\text{m}$, -■-; $40\text{ }\mu\text{m}$, -◆-.

A resistência à transferência de PVA em filmes a base de proteínas é limitada devido ao caráter hidrofílico da proteína. Segundo MARTIN-POLO & VOLLEY (1990) as etapas de dissolução e evaporação são influenciadas pela solubilidade do permeante no filme. Neste caso, as moléculas de água, de baixo peso molecular, são facilmente adsorvidas na rede protéica, de características hidrofílicas, tanto quanto no glicerol, também de caráter hidrofílico. Este efeito foi também mencionado por STUCHELL & KROCHTA (1994) em filmes de proteínas de soja com adição de plasticizante e por GNANASAMBANDAM et al. (1997), em filmes a base de proteínas de farelo de arroz. A molécula de água ao ser adsorvida no interior da rede protéica, provoca um inchamento da rede protéica com provável aumento da difusão das moléculas de água, que torna os filmes a base de proteínas poucos eficientes com relação a barreira ao vapor de água.

Também se verifica que a permeabilidade média aumenta com a espessura Figura (4.4). Este comportamento do filme a base de proteínas miofibrilares indica que o polímero não se adequou a lei de Fick, ou seja, a difusividade das moléculas de água pode não ser constante, como também o coeficiente de solubilidade da lei de Henry, de sorção, este efeito pode ser devido a interação do permeante à rede protéica e a variação da estrutura do filme em função da espessura (GENNADIOS et al., 1990).

Os valores de PVA de vários tipos de biofilmes podem ser comparados, considerando as condições (diferença de umidade relativa e temperatura), em que foram realizadas as análises. A Tabela (4.3) compara os valores de PVA de filmes a base de proteínas, de origens e processos de extrações diferentes com filmes de polímeros sintéticos.

Tabela 4.3 – Coeficiente de permeabilidade ao vapor de água de biofilmes a base de proteínas miofibrilares bovina comparada a outros filmes comestíveis e/ou biodegradáveis e filmes sintéticos.

Filme	Espessura (μm)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	UR (%)	Permeabilidade. 10^{-12} ($\text{mol.m/s.m}^2.\text{Pa}$)
Glúten ^{4,01}	150	25	50 - 100	261,10
GGs* (15:6:0) ²	87	25	50 - 100	78,33
GGs* (15:4:2) ²	87	25	50 - 100	63,90
RB* ^{9,53}	190	23	55 - 100	44,44
Glúten e Glicerol ⁴	50	30	0 - 100	41,50
Pure de pêssego ⁵	92	25	0 - 75	37,70
IP* de soja ¹	78	28	0 - 78	28,10
Zeína de milho ⁶	120	21	0 - 85	6,40
PM* de sardinha ⁷	60	25	0 - 100	3,90
PM* de Tilápia-do-nilo ⁸	47	22	0 - 100	3,80
Glúten ⁹	127	23	0 - 11	3,11
PM* bovina ¹⁰	94	22	0 - 100	1,52
PM* bovina ¹¹	40	25	0 - 100	0,24
LPDE* ¹²	14	23	55 - 100	0,027
HDPE* ¹³	25	38	0 - 97	0,0122
Glúten + Cera de abelha ⁴	120	25	0 - 87	0,0122
Saran ^{®11}	12	23	55 - 100	0,0022

Fonte: ¹GENNADIOS et al. (1993a); ²CHERIAN et al. (1995); ³GNANASAMBANDAN et al. (1997); ⁴GONTARD (1991); ⁵McHUGH et al. (1996); ⁶PARK & CHINNAN (1995); ⁷CUQ et al. (1995); ⁸MONTERREY-Q (1998); ⁹GENNADIOS et al. (1993b); ¹⁰OCUNO & SOBRAL (1998); ¹¹Este estudo; ¹²CHEN (1995); ¹³Apud CUQ et al. (1995);

* GGS-Glúten-glicerina-sacarose; RB-Proteínas de farelo de arroz; IP-Isolado protéico; PM-Proteínas miofibrilares; LPDE-Polietileno de baixa densidade; HDPE-Polietileno de alta densidade; Saran-copolímero de PVDE – policloreto de vinilideno.

Observando a Tabela (4.3), os valores de PVA de filmes a base de proteínas miofibrilares apresentaram melhores valores do que a maioria dos filmes. Entretanto, os filmes de polímeros sintéticos ainda são mais resistentes a difusão de umidade do que de proteínas. Os biofilmes a base de proteínas miofibrilares apresentam alta densidade dos aminoácidos Asparagina (Asp) e Glutamina (Glu) ricos em grupos (-CO e -NH) que contribuem com ligações do tipo pontes hidrogênio e facilmente substituídas por ligações proteína-glicerol, que facilitam adsorção de água. Esta troca é favorável dada a quantidade de energia gasta para substituição da dupla ponte de hidrogênio (85 kJ/mol) entre os grupos reativos por somente uma ponte de hidrogênio (25 kJ/mol) entre dois grupos reativos e uma molécula de plasticizante. À medida que o teor de glicerol aumenta entre as moléculas, também aumenta o espaço livre entre elas, facilitando a permeação das moléculas de água, diminuindo ainda mais a resistência dos filmes, hipótese levantada por (CUQ et al., 1997).

4. CONCLUSÃO

A força na ruptura dos filmes diminui com a espessura em função do teor de umidade dos filmes até alcançar 35% (b.u). Acima deste valor a espessura dos filmes e a umidade relativa não influenciaram.

A deformação na ruptura apresentou visivelmente dois patamares, sendo que o primeiro foi até a umidade em torno de 35 g de água/g de matéria seca, aproximadamente 75% UR e enquanto o segundo foi acima desse valor de umidade.

O aumento do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água em função da espessura foi mais evidente à medida que a umidade relativa ambiente aumentou. Visto que o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água depende da espessura dos filmes e também das condições ambientais é necessário padronizar a espessura e a condição ambiental, para uma específica permeabilidade ao vapor de água.

Os valores do coeficiente de permeabilidade ao vapor de água determinados, foram da ordem $0,24 \cdot 10^{-12}$ mol.m/s.m².Pa, abaixo da maioria dos polímeros sintéticos e acima dos biofilmes produzidos a partir de macromoléculas hidrofílicas.

5. BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Annual Book of ASTM Standards**. Philadelphia: ASTM, 1988, 1990.
- BANKER, G.S. Film coating theory and practice. **Journal Pharmaceutical**. v.55, p.81-89, 1966.
- BIQUET, B.; LABUZA, T.P. Evaluation of the moisture permeability characteristics of chocolate films as an edible moisture barrier. **Journal of Food Science**. v.53, n.4, p.989-997, jul./ago. 1998.
- CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal Food Science**. v.78, .11, p.2563-2583, 1995.
- CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol. **Cereal Chemistry**. v.72, n.1, p.1-6, 1995.
- CUQ, B. **Mise en forme et caractérisation de biomatériaux à base de protéines myofibrillaires**. Montpellier: Université Montpellier II, 1996. 213p. (Tese, Doctourado em Biochimie et technologies Alimentaires).
- CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. **Journal of Food Science**. v.60, n.6, p.1369-1374, nov./dez. 1995.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.-L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**. v.61, n.3, p.580-584, maio/jun. 1996.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.45, n.3, p.622-626, 1997.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology**. v.44, n.10, p.63-69. 1990.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; TESTIN, R.F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**. v.70, n.4, p.426-429, jul./ago. 1993a.
- GENNADIOS, A.; PARK, H.J.; WELLER, C.L. Relative humidity and temperature effects on tensile strength of edible protein and cellulose ether films. **Transactions of the ASAE**. v.36, n.6, p.1867-1872, nov./dez. 1993b.

- GNANASAMBANDAM, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; COLEMAN, M. Mechanical and barrier properties of rice bran films. **Journal of Food Science**. v.62, n.2, p.395-398, mar./abr. 1997.
- GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. Montpellier, 1991. 174p. Tese (Doutor en Sciences des Aliments) - Université Montpellier II, Académie de Montpellier.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glicerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**. v.58, n.1, p.206-211, jan./fev. 1993.
- MAHMMOUD, R.; SAVELLO, P.A. Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. **Journal Dairy Science**. v.75, n.4, p.942-946, abr. 1992.
- McHUGH, T.H.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; 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, jul./ago. 1993.
- McHUGH, T. H.; HUXSOLL, C.C.; KROCHTA, J.M. Permeability properties of fruit puree edible films. **Journal of Food Science**. v.61, n.1, p.88-91, 1996.
- MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A. Comparative study of the water permeability of edible film composed of arabic gum and of glycerolmonostearate. **Sciences des Aliments**. v.10, n.2, p.473-483, jun. 1990.
- MONTERREY-Q, E.S. **Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes**. Tese de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 1998.
- MONTERREY-Q, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.179-190, 2000.
- OCUNO, D.; SOBRAL, P.J.A. Preparo de proteínas miofibrilares de carne e elaboração de biofilmes com dois tipos de ácidos: propriedades mecânicas. **Brazilian Journal of Food Technology**. V.1, n.1 e 2, p.44-52, jan/dez. 1998.
- PARK, H..J.; CHINNAN, M.S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**. V.25, p497-507, 1995.
- PARK, J.H.; WELLER, C.L.; VERGANO, P.J.; TESTIN, R.F. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. **Journal of Food Science**. v.58, n.6, p.1361-1364 e 1370, nov./dez. 1993.
- ROOS, Y. **Phase transitions in food**. Academic Press, San Diego, 360 p, 1995.

STUCHELL, Y.M.; KROCHTA, J.M. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. **Journal of Food Science.** v.59, n.6, p.1332-1337, nov./dez. 1994.

CAPÍTULO 5

MICROESTRUTURA E TRANSIÇÃO VÍTREA

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a calorimetria diferencial de varredura (DSC) tem sido aplicada em diversos trabalhos de determinação de propriedades termofísicas de alimentos. A aplicação do conceito transição vítrea está sendo valiosa no entendimento do comportamento físico químico da complexa estrutura de filmes comestíveis (CUQ et al., 1997bc; CHERIAN et al., 1995; SERENO et al., 1998; KALICHEVSKV et al., 1993; DEBEAUFORT & VOILLEY, 1997; MENEGALLI et al., 1998). As maiores vantagens apresentadas por esta técnica são a rapidez e a acuracidade.

O termo temperatura de transição vítrea (T_g) refere-se à temperatura na qual ocorre uma mudança de fase de segunda ordem, nos materiais amorfos (PEREZ, 1994). A temperatura T_g é específica de cada material e corresponde à ocorrência de uma transição de ordem estrutural que influencia as propriedades, e separa os materiais em dois domínios: o estado borrachoso e o vítreo. Abaixo da T_g , o material é rígido e, acima ele se torna viscoelástico e ainda líquido. O efeito do plasticizante é bem conhecido: ele diminui a temperatura de transição vítrea (T_g) do sistema. A temperatura de transição vítrea é um importante parâmetro físico na ciência de alimentos porque ela procura explicar as alterações estruturais indesejáveis dos materiais amorfos através do comportamento físico e químico. Materiais amorfos no estado vítreo são materiais de viscosidade extremamente alta ($\eta = 10^{12}$ Pa.s). A estrutura de um sólido vítreo pode ser considerada como uma distribuição ao acaso de regiões flutuantes com locais de alta densidade espacial e alta energia (e entropia) numa desordenada atômica contínua (PEREZ, 1994). O material, acima da T_g , apresenta uma mobilidade cooperativa de todas as moléculas e de segmentos das cadeias poliméricas ou de pequenas moléculas nas regiões amorfas. Abaixo da T_g , tem-se o estado vítreo onde a mobilidade molecular é fraca, restringindo-se a movimentos rotacionais de pequena amplitude e a vibrações locais isoladas de modo não cooperativo. Este estado é muito sensível à mudança de temperatura e teor de umidade, sendo que estes materiais no estado vítreo apresentam características típicas de serem quebradiços e transparentes (ROOS, 1995). As condições ambientes têm um efeito importante sobre a T_g , sendo que o material de comportamento higroscópico também aumenta o teor de umidade

de equilíbrio promovendo uma diminuição da Tg (SLADE & LEVINE, 1991). O aumento da mobilidade molecular em alguns casos tem efeito plasticizante no material. Portanto, uma substância de baixo peso molecular adicionada ao material pode diminuir a Tg do material e, portanto provocar plasticização.

O estado gomoso do material protéico, constituído de proteínas miofibrilares, pode ser provocado também pelo aumento de temperatura. Embora esse estado não seja estável, as transformações que ocorrem na forma α -hélice passam por dois estágios, para alcançar a temperatura de fusão: (1) decréscimo das interações entre cadeias e (2) desdobramento da estrutura α -hélice. Ambas são desestabilizadas pela mudança de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (SAMEJIMA et al., 1983).

A água e outros componentes de baixo peso molecular como sorbitol e sacarose são capazes de interagir com o biopolímero, p.e. proteínas, provocando uma diminuição na Tg (GONTARD & RING, 1996; CUQ et al., 1997bc).

ROOS & KAREL (1991) verificaram o efeito plasticizante da água, em soluções modelos de açúcares desidratados como a α -lactose, a sacarose, a sacarose/frutose e a sacarose com o amido modificado de alto teor de amilopectina. As soluções mostraram comportamento típico de materiais amorfos, e a água agindo como plasticizante. O mesmo comportamento foi observado por CUQ et al. (1997ab), em filmes a base de proteínas miofibrilares de peixe, plasticizados com sorbitol e sacarose, quando se aumentou a concentração de água. O efeito do plasticizante ou diluente também depende da sua afinidade com a matriz do polímero, além do seu peso molecular. A compatibilidade entre o plasticizante e a matriz é necessária para um bom efeito plasticizante, o qual é alcançado pela diminuição do peso molecular e o aumento das interações entre polímeros e o plasticizante, enquanto a separação de fases também pode indicar pouca afinidade. CHERIAN et al. (1995) observaram em filmes a base de glúten boa miscibilidade da glicerina e do sorbitol no glúten, quando verificaram a presença de uma única Tg, intermediária à transição entre as combinações glúten-glicerina e glúten-sorbitol. A melhor afinidade entre o glúten e a glicerina foi relacionada com a receptividade desta pela matriz protéica hidrofílica, seguida pela difusão de água, e ao mesmo tempo plasticizando o filme,

que se verificou com o aparecimento do pico e a $T_g -60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entretanto quando se adicionou a sacarose a mistura apresentou comportamento adverso, mostrando-se incompatível, com separação de fases. Resultados de separação de fases foram também observados por KALICHEVSKV et al. (1993) ao misturar açúcar e caseína, a T_g da caseína permaneceu inalterada, não se verificando miscibilidade dos componentes. Resultados semelhantes foram encontrados na combinação da água com a caseína, o caseinato de sódio, a amilopectina e o glúten. A caseína e o caseinato de sódio foram menos plasticizados pela água do que a amilopectina e glúten. A propriedade térmica, T_g , vem sendo determinada em vários alimentos, com intuito de elucidar aspectos microestruturais: proteína miofibrilar de peixe (CUQ et al., 1997a), glúten de trigo (CHERIAN et al., 1995; GONTARD & RING, 1996), gelatina (MENEGALLI et al., 1998) e metilcelulose (DEBEAUFORT & VOILLEY, 1997).

O objetivo deste trabalho é o estudo da transição vítrea de filmes comestíveis de proteína miofibrilar bovina plasticizado pela glicerina em função do teor de umidade, por colorimetria diferencial de varredura (DSC). Outro objetivo foi observar e relacionar os aspectos morfológicos das proteínas miofibrilares liofilizadas e do filme resultante, a partir do exame microestrutural no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA E FORMAÇÃO DO FILME

Utilizaram-se as proteínas miofibrilares obtidas segundo o método descrito em material e métodos do **Cap.2**, item 2.1. Os biofilmes foram preparados com uma espessura única ($0,040\text{ mm}\pm 0,08$) e secos nas mesmas condições mencionada no **Cap.3**, item 2.2.

2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de proteínas miofibrilares liofilizadas e dos filmes a base das mesmas

foram preparadas, seguindo-se o método de MARTIN-POLO et al. (1992) e McHUGH & KROCHTA (1994), para serem analisadas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV). A amostra da proteína miofibrilar liofilizada foi colada em “stubs” próprios com fita alumínio dupla-face, descolou-se a lâmina de alumínio da outra face, fez-se uma leve pressão contra o pó liofilizado, e em seguida retirou-se o excesso, conseguindo-se assim aderência do material à parte colante da fita.

Amostras de aproximadamente 3 x 18 mm, retiradas da região central dos filmes, para se evitar possíveis injúrias nas bordas foram submetidas ao congelamento rápido com nitrogênio líquido. Depois foram cuidadosamente fraturadas de modo que a região de fratura não fosse danificada. Para isso, os pedaços de biofilmes foram fixados, com pinça própria, sempre nas bordas. Em seguida os pedaços fraturados e devidamente identificados foram colocados em placas de Petri forradas com papel de filtro. As amostras preparadas de biofilmes e de proteínas miofibrilares liofilizadas foram acondicionadas em dessecadores sob vácuo com sílica gel desidratada (0 % UR) por 72 horas (3 dias), para retirar toda umidade. O vácuo foi alcançado quando a pressão no dessecador tornou-se constante, com o auxílio de bomba de vácuo.

Depois de retirada toda umidade, as amostras foram fixadas com uma camada de ouro por evaporação num evaporador Balzers Sputter Coater (Modelo SCD050). Os materiais foram então submetidos à análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) - (Modelo JEOL/ JXA - 840A Electronprobe microanalyzer). Os resultados observados no MEV foram fotografados com filme Trix 400 ASAS P & B.

2.3 ANÁLISE DSC

Inicialmente, as amostras de filmes e de proteínas miofibrilares foram equilibradas em recipientes plásticos hermeticamente fechados, sob atividades de água (a_w) de 0,07 a 0,90, a 25 °C. Quando o equilíbrio foi atingido, os filmes foram pesados diretamente nas cápsulas e submetidos à análise de DSC. Os teores de umidade de equilíbrio das amostras foram obtidos a partir das isotermas de adsorção (Apêndice.B). Determinou-se a umidade das amostras em estufa ventilada a 100 °C por 24 h. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), foram utilizadas amostras previamente pesadas, em balança analítica (Scientech SA-210), da ordem de 10 mg ($\pm 0,1$ mg), colocadas em cápsulas de alumínio TA hermeticamente fechadas. As amostras foram aquecidas a uma taxa de 5 °C/minuto (CUQ et al., 1997), passando por uma corrente a 100 mL/minutos de nitrogênio (N₂), num DSC Modelo TA2010 equipado com um controlador TA4000. A referência utilizada foi uma cápsula vazia. Na primeira varredura, a temperatura de varredura ficou entre -120 °C e 60 °C. Após, a célula no DSC foi totalmente congelada com N₂, quando foi observada a T_g de glicerina, na segunda varredura. A calibração padrão utilizada foi indium suprido pelo TA. Os resultados foram analisados pelo Universal Analyzer TA Software, considerando a T_g como ponto médio de inflexão. A temperatura de fusão (T_m) foi definida como a temperatura em que a taxa de fusão é máxima, ou seja, a temperatura do pico de transição endotérmico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As proteínas liofilizadas aparecem como um conjunto desordenado de partículas cristalizadas de diferentes tamanhos (Figura 5.1a). Observam-se pequenos cristais sobre a superfície que poderiam ser frações de proteínas de baixo peso molecular como tropomiosina, troponina e α -actinina (Figura 5.1a). Nota-se também entre os cristais e sobre as superfícies dos cristais de proteínas na Figura (5.1b) de maior aumento, pequenas partículas de forma hexagonal dando a impressão de ser outro material de menor tamanho, mas também semelhantes a cristais.

Na Figura (5.2) são apresentadas microfotografias realizadas sobre um filme de proteínas miofibrilares de carne bovina. Neste caso, a superfície do filme vista no microscópio eletrônico de varredura, a base de proteínas miofibrilares de carne bovina, revela uma estrutura externa pouco homogênea, porém coesa e densa. A pouca homogeneidade da superfície de secagem deve-se provavelmente aos canais formados no

interior da estrutura do biofilme, para a saída da água, formando poros na superfície (Figura 5.2). Aparentemente os filmes se constituem de uma rede protéica contendo no interior moléculas de glicerol adsorvidas que contribuem significativamente para as propriedades físicas e de textura destes filmes (GONTARD, 1992; CUQ, 1996).

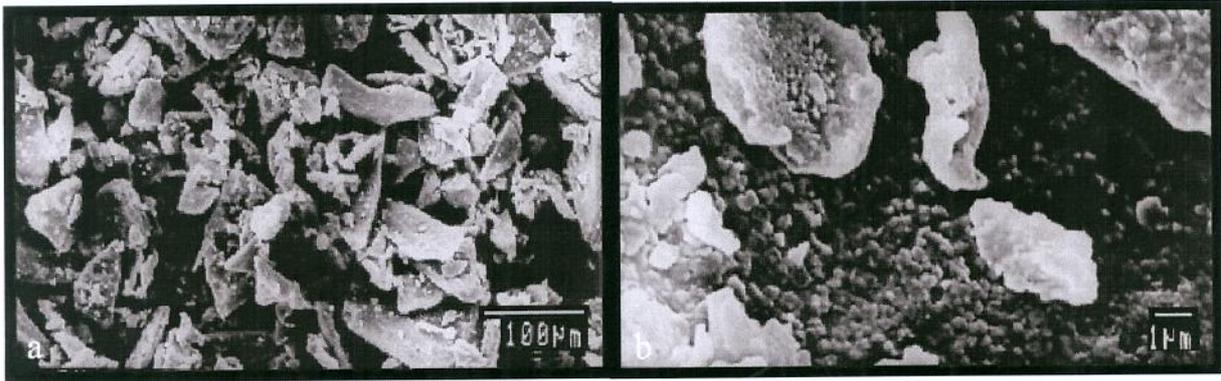


Figura 5.1 - Microfotografia eletrônica de varredura do concentrado de proteínas miofibrilares liofilizadas, armazenadas a 5 °C. a-200 X; b-7.500 X.

A fotografia eletrônica de varredura da fratura ou da secção transversal do filme revelou uma estrutura da matriz do filme de proteína fina e compacta (Figura 5.3a) que melhor explica as propriedades mecânicas de força e deformação e a permeabilidade baixa. Nota-se também a formação de canais (C), entre a matriz de proteína em direção à superfície oposta (SE) ao lado de contato com o suporte do filme. Estes canais provavelmente foram formados pela água e o glicerol presente no filme, evaporado durante o vácuo a que foi submetida a amostra para retirada de toda umidade da mesma.

Na Figura (5.3a) nota-se o aparecimento de vários pontos brancos (MI), evidenciados na Figura (5.3c), que são materiais insolúveis como proteínas estromáticas e proteínas insolúveis em solução salinas de baixa concentração (0,1 M), e também imperfeições como as fendas (F) visíveis, que foram ocasionadas pelo tratamento de vácuo aplicado à amostra, que eliminaria a glicerina livre (Figura 5.3b), utilizada como plasticizante aparentemente não totalmente miscível com as proteínas miofibrilares. Estas descontinuidades da rede protéica poderiam ser de regiões em que havia somente glicerol e

água, caracterizando na fotografia o aparecimento de diferentes fases constatadas também nos dados de calorimetria diferencial de varredura (DSC), que se discutem no item seguinte.

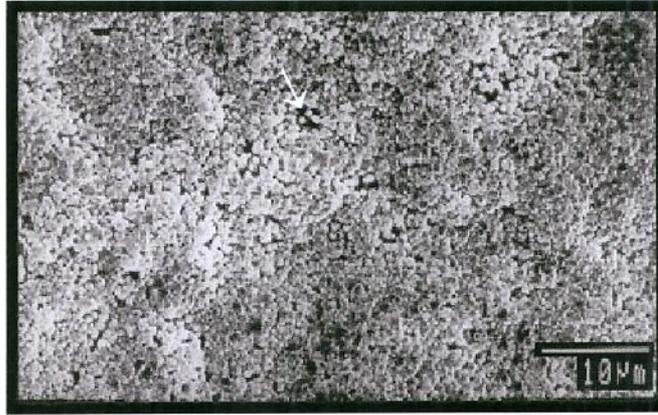


Figura 5.2 - Microfotografia eletrônica de varredura de biofilme produzido de proteínas miofibrilares ($C_p=1\%$ p/p), glicerol ($C_g=60\%$ p/p proteína seca) e $pH=2,8$. 2.000 X. A seta evidencia pequenos cristais na superfície do filme.

Estas descontinuidades da rede protéica poderiam ser de regiões em que havia somente glicerol e água, caracterizando na fotografia o aparecimento de diferentes fases constatadas também nos dados de calorimetria diferencial de varredura (DSC), que se discutem no seguinte item (3.2). A presença destas fendas e poros na estrutura dos filmes podem comprometer a integridade estrutural do filme e, conseqüentemente provocar modificações nas propriedades funcionais. O aparecimento de fendas também na superfície, indica provavelmente os caminhos percorridos pela água de migração até a parte externa do biofilme (SE), durante o processo de secagem da amostra. Este fato poderia explicar a formação de cristais de tamanho menor que $8\ \mu m$ distribuídos regularmente na superfície do filme aparecendo praticamente em toda região superficial (Figura 5.2), sendo que, em algumas regiões, em áreas menores, os cristais não são vistos (Figura 5.4c). Logo, os cristais de sais sobre a superfície poderiam ser resultado da migração destes solubilizados na água que permeia o filme durante a secagem. A este comportamento dá-se o nome de “case hardening”. Na Figura (5.4) se apresenta um outro corte transversal do filme onde estes cristais de sais aparecem bem caracterizados.

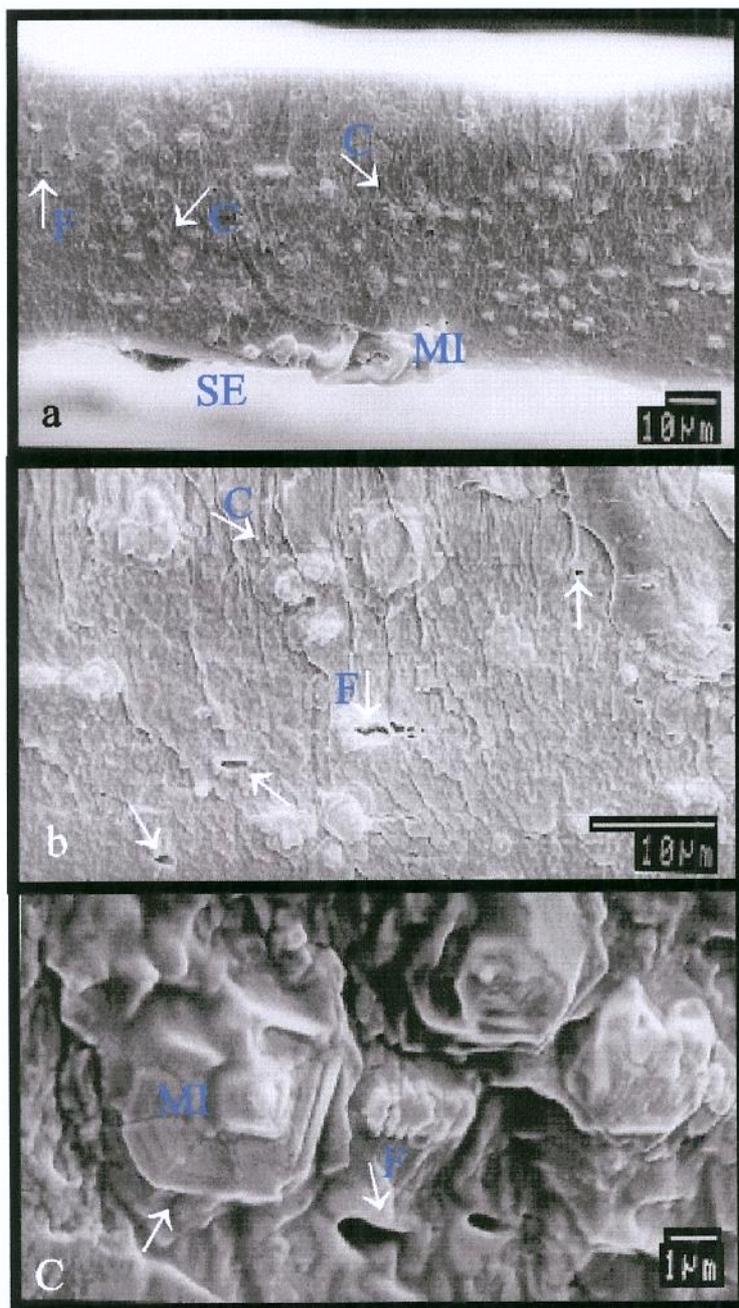


Figura 5.3 - Microfotografia eletrônica de varredura, corte transversal inclinado 40° , de biofilme produzido de proteínas miofibrilares ($C_p=1\%$ p/p), glicerol ($C_g=60\%$ p/p proteína seca) e $pH=2,8$, armazenadas à $5^{\circ}C$. a- 750 X; b- 2000 X e c- 7.500 X. C (canais); F (fendas); MI (materiais insolúveis) e SE (superfície externa do filme).

Ainda com relação à Figura (5.4a), a seta mostra a presença de proteínas na forma cristalina pura, suportando a hipótese da existência de diferentes fases. Como se observa, os cristais que aparecem de cor branca na fotografia estão em toda parte, no interior do filme,

sobre a superfície de materiais insolúveis e no interior da rede protéica.

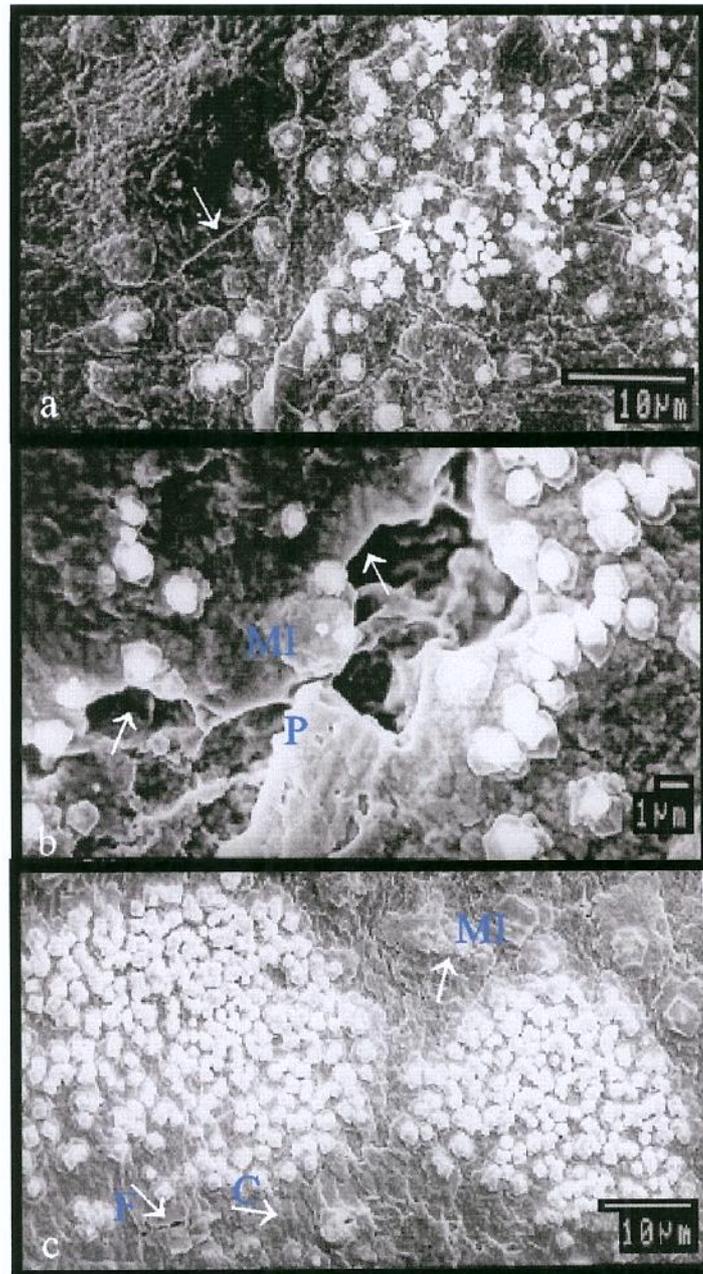


Figura 5.4 - Microfotografia eletrônica de varredura de biofilme produzido de proteínas miofibrilares (Cp=1 % p/p proteína), glicerol (Cg=60 % p/p proteína seca) e pH=2,8, armazenadas à 5 °C. a- 2.000 X; b- 5.000 X e c- 1.500 X. C (cristais); F (fendas); MI (materiais insolúveis) e P (proteína).

Na Figura (5.4b) é visível a presença semicontínua de cristais de sais no interior e sobre a matriz de proteína, onde também se observa uma estrutura bem característica de rede protéica com um grande número de cavidades, que podem ser os espaços vazios anteriormente ocupados pela fração de água e glicerol fixados em regiões isoladas, intramoleculares. Resultados similares foram observados por YANG & FRONING (1992). Na Figura (5.4b), corte transversal, pode-se observar a existência de fendas, materiais insolúveis, canais e aglomerados de cristais.

3.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Todas as análises de transição vítrea foram realizadas em duplicatas, os dados foram obtidos através das Figuras (5.5 e 5.6). Os termogramas dos biofilmes são típicos de um sistema gel, semelhantes aos de géis de gelatina com polióis e açúcares observados por NISHINARI et al. (1997). Os termogramas mostraram duas temperaturas de transição vítrea (T_g) na primeira varredura (Figura 5.5). A primeira T_g aparece em torno de $-53\text{ }^\circ\text{C}$ ($a_w=0,07$, $X=0,32$ g de água/g de matéria seca) e $-98\text{ }^\circ\text{C}$ para $a_w=0,75$ e $X=0,7$ g de água/g de matéria seca. A segunda T_g aparece em torno de $-13\text{ }^\circ\text{C}$ em baixas a_w , p.e., entre 0,07 e 0,65 e diminui a $-25\text{ }^\circ\text{C}$ para $a_w=0,75$. Nota-se uma alteração nas curvas, entre a faixa de temperatura -45 a $-95\text{ }^\circ\text{C}$, onde a primeira T_g é bem visível e certamente corresponde a fase proteína-água-glicerina. A segunda T_g , menos visível, deve-se à porção da proteína menos solúvel.

Na segunda varredura das mesmas amostras, quando a temperatura da célula no DSC foi reduzida rapidamente até a temperatura acima da primeira T_g , a segunda T_g aparece mais visível. Os valores e comportamento desta T_g permanecem inalterados, em relação aos observados na 1ª varredura. A segunda T_g aparece claramente, próxima de $-11\text{ }^\circ\text{C}$ em baixa a_w , entre 0,07 e 0,65 e diminui a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ na $a_w=0,75$, mas sempre menos importante do que a primeira T_g (Figura 5.5).

Observa-se, à medida que o teor de umidade aumenta no biofilme verifica-se um aumento da depressão na temperatura de transição vítrea, e ao mesmo tempo esta visibilidade melhora. Isto indica a atuação da água como plasticizante no biofilme a base de proteínas miofibrilares. O aparecimento de duas T_g corresponde a suposição de

heterogeneidade do biofilme, uma vez que a segunda Tg, tanto na primeira, como na segunda varredura mostra um ΔC_p pequeno. Este resultado vem de encontro aos da literatura, que menciona valores de C_p pequenos para substâncias orgânicas como proteínas (SLADE & LEVINE, 1991). Nota-se também na Figura 5.5, o aumento de ΔC_p na primeira Tg em função do teor de umidade do biofilme, onde se encontra a fração de proteína solúvel na fase água-glicerina. Enquanto, o ΔC_p da segunda Tg, constituída da fração proteína, permanece praticamente pouco visível até o teor de umidade 0,7 g de água/ 100 g de matéria seca, quando, então, aparecem dois picos na altura da segunda Tg ao atingir o teor de umidade 0,9 g água/ 100 g matéria seca. Entretanto, diante da aparente miscibilidade entre proteína e o plasticizante glicerol usado, quando visualizamos somente uma Tg, estes picos podem ser explicados como consequência de separação de fases, que ao sofrer descongelamento a fração glicerina-água, provocou o aparecimento de picos Tm (temperatura de fusão).

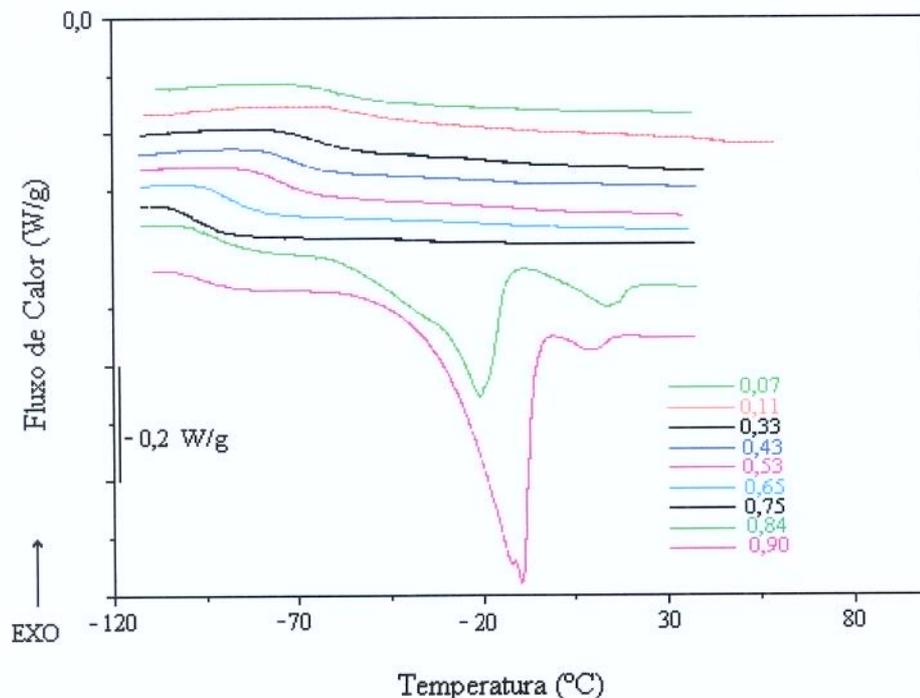


Figura 5.5 - Primeira varredura dos termogramas DSC de filme comestível a base de proteína miofibrilar em função da a_w .

Os dois picos endotérmicos aparecem em alta a_w . As temperaturas observadas no primeiro pico foram -23 e -11 °C e no segundo pico, 13 e 10 °C, em $a_w=0,84$ e 0,90, respectivamente. Estes dois picos são também visíveis na segunda varredura (não mostrado), sendo que as temperaturas registradas no primeiro e no segundo pico foram as mesmas. Neste caso, o primeiro pico é devido a fusão da solução aquosa de glicerina, e o deslocamento do ponto de fusão para a direita deve-se ao efeito da glicerina. O segundo pico é uma transição sol-gel do sistema hidratado solúvel proteína-glicerina.

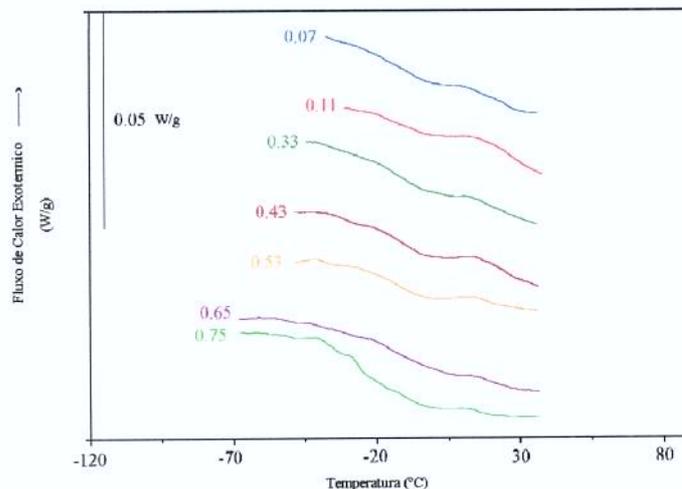


Figura 5.6 - Segunda varredura dos termogramas DSC de filme comestível a base de proteína miofibrilar em função da a_w .

A T_g da fração protéica insolúvel é menos visível pois envolve variações de entalpia, em escala monomérica. CHERIAN et al. (1995) observaram que o comportamento térmico de filme a base de proteína de trigo não pode ser estudado pelo DSC porque a variação na capacidade calorífica durante a T_g é muito pequena. Mas no trabalho de CUQ et al. (1997b), a transição vítrea de filme comestível a base de proteína miofibrilar de peixe é bem visível. Todavia neste estudo, a T_g aparece acima de 30 °C. A redução da T_g com aumento da a_w , e conseqüentemente, aumento do teor de umidade do filme, deve-se ao

efeito plasticizante da água. Este comportamento é bem comentado na literatura, para biopolímeros e filmes comestíveis (SLADE & LEVINE, 1991; ROOS, 1995; CHERIAN et al., 1995; CUQ et al., 1997a,b,c; DEBEAUFORT & VOILLEY, 1997).

Observa-se que a Tg da fração rica em glicerina diminui gradativamente com o teor de umidade (Figura 5.7), como um monômero compatível na água (SLADE & LEVINE, 1991). A Tg do plasticizante foi também determinada por DEBEAUFORT & VOILLEY (1997) em filmes a base de metilcelulose-PEG400 e por CHERIAN et al. (1995), em filmes a base de glúten de trigo plasticizado pela glicerina, os quais observaram que o valor da Tg da porção glicerina é superior a Tg da glicerina pura (-93 °C). Este fato pode ser explicado pela solubilização da proteína nesta fase.

Em relação à Tg da proteína miofibrilar menos solúvel determinada em ambas primeira e segunda varreduras, esta decresce em relação ao conteúdo de água em forma inversa, se mantém aproximadamente constante até 60% (b.s) de umidade, para logo

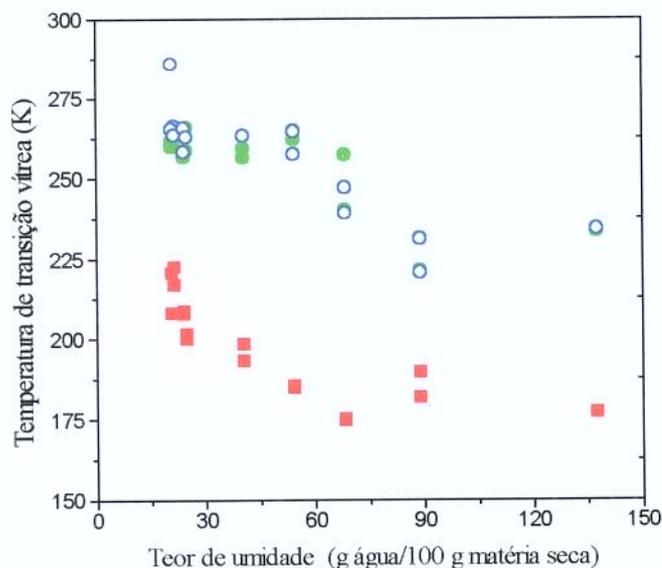


Figura 5.7 - Temperatura de transição vítrea pela calorimetria diferencial de varredura (DSC) de filme a base de proteína miofibrilar bovina. Tg da fração rica em glicerina, 1ª varredura: ■; Tg da fração proteína menos solúvel, 1ª varredura: ● e 2ª varredura: ○.

decrecer até um novo valor para umidades de 90% (b.s). Para a fase de proteína insolúvel a queda hiperbólica da Tg representa a hidratação da macromolécula. Em alto conteúdo de água, a Tg determinada corresponde à máxima hidratação possível da macromolécula e, posteriormente, tende a um valor constante.

Estes resultados confirmam que filmes comestíveis a base de proteína miofibrilar podem ser considerados como constituídos por uma fração de proteína hidratada menos solúvel e uma fase aquosa bem plasticizada (CUQ et al., 1997c).

4. CONCLUSÃO

A fotografia eletrônica de varredura do filme revelou uma microestrutura não homogênea, com fendas que podem ter sido provocadas pela evaporação da fração solúvel de glicerina e a presença de várias fases.

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que filmes comestíveis a base de proteína miofibrilar não são sistemas homogêneos do ponto de vista físico-químico, devido às separações de fase entre as frações ricas em macromolécula e plasticizante. O filme comestível é flexível e tem boa facilidade de manuseio e aplicação visto que a Tg observada do sistema proteína é menor que a temperatura ambiente.

Esses resultados estão de acordo com as observações da microestrutura realizadas no MEV sobre a superfície plana e na fratura do filme, onde se nota uma rede de proteína coesa de raras falhas, as quais podem corresponder a espaços ocupados pelas frações plasticizante-água ou água.

5. BIBLIOGRAFIA

- CHERIAN, G.; GENNADIOS, A.; WELLER, C.; CHINACHOTI, P. Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol. **Cereal Chemistry**. v.72, n.1, p.1-6, 1995.
- CUQ, B. **Mise en forme et caractérisation de biomatériaux à base de protéines myofibrillaires**. Montpellier: Université Montpellier II, 1996. 213p. (Tese, Doctourado em Biochimie et technologies Alimentaires).
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.45, n.3, p.622-626, 1997a.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermoplastic properties of fish myofibrillar protein: application to biopackaging fabrication. **Polymer**. v.38, n.10, p.2399-2405, 1997b.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by moisture content. **Polymer**. v.38, n.16, p.4071-4078, 1997c.
- DEBEAUFORT F., VOILLEY A. Methylcellulose-based edible films and coatings: 2. Mechanical and thermal properties as a functions of plasticizer content. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.45, p.685-689, 1997.
- GONTARD, N. **Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten**. Montpellier, 1991. 174p. Tese (Doutor en Sciences des Aliments) - Université Montpellier II, Academie de Montpellier.
- GONTARD, N.; RING, S. Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. **Journal Agricultural of Food Chemistry**. v.44, n.11, p.3474-3478. nov. 1996.
- KALICHEVSKV, M.T.; BLANSHARD, J.M.V.; TOKARCZUK, P.F. Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate. **International Journal of Food Science and Technology**. v.28, n.2, p.139-151, 1993.
- MENEGALLI, F.C.; SOBRAL, P.J.A.; ROQUES, M.A. **Characteristics of gelatin biofilms in relation to drying process conditions**. Proceedings of the 11th. International Drying Symposium, Halkidiki, Greece, 19-22 agosto de 1998. vol.c, p.1704-1712.
- NISHINARI, K.; WATASE, M; HATAKEYAMA, T. Effects of polyols and sugars on the structure of water in concentrated gelatin gels as studied by low temperature differential scanning calorimetry. **Colloid Polymer Science**. v.275, p.1078-1082, 1997.

- PEREZ, J. Theories of liquid-glass transition. **Journal of Food Engineering**. v.22, n.11, p.89-114, 1994.
- ROOS, Y.; KAREL, M. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. **Journal of Food Science**. v.56, n.1, p.38-43, jan./fev. 1991.
- ROOS, Y. **Phase transitions in food**. Academic Press, San Diego, 360 p, 1995.
- SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M.; YASUI, T. Scanning calorimetric studies on thermal denaturation of myosin and its subfragments. **Agricultural biological Chemistry**. V.40, n.10, p.2373-2380, 1983.
- SERENO, A.M.; SÁ, M.M.; FIGUEIREDO, A.M. **Glass transitions and state diagrams for freeze-dried and osmotically dehydrated apple**. Proceedings of the 11th. International Drying Symposium, Halkidiki, Greece, 19-22 agosto de 1998. vol.b, p.1214-1220.
- SLADE L., LEVINE H. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, 30(2,3) 115-360, 1991.
- SOBRAL, P.J.A. **Diffusivité de l'eau dans le gel polyacrylamide-eau autour de la transition vitreuse**. Tese Doutorado, INPL, Nancy, França.
- YANG, T.S.; FRONING, G.W. Selected washing processes affect thermal gelation properties and microstructure of mechanically deboned chicken meat. **Journal of Food Science**. v.57, n. 2, mar./apr. 1992.

CAPÍTULO 6

ISOTERMAS DE SORÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Trabalhos recentes utilizando proteínas miofibrilares de peixe realizados por CUQ et al. (1995); MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL (2000); MONTERREY-QUINTERO (1998) demonstraram o potencial que as proteínas possuem em formar filmes transparentes e bastante resistentes. Entretanto, estes filmes sofrem grande influência das condições ambientais, temperatura e umidade relativa. As proteínas são sensíveis à umidade devido à característica hidrofílica das macromoléculas que tornam as propriedades funcionais dos filmes dependentes do teor de umidade deles e, portanto, da umidade relativa ambiente. O efeito do teor de umidade sobre as propriedades funcionais dos filmes influencia fortemente na escolha do polímero, para a determinação das condições adequadas de armazenamento. Estudos recentes de força e deformação de filmes de zeína condicionados a 25 °C por dois dias, determinaram que a força de ruptura dos filmes de 19,5 MPa a 23% umidade relativa para 5,7 MPa a 75% umidade relativa (GENNADIOS et al., 1994). Similarmente, os mesmos autores verificaram em biofilme de glúten, condicionado a 25 °C por dois dias, uma diminuição de 5,2 MPa a 23% umidade relativa para 2,7 MPa a 75% umidade relativa. (1994). Outra propriedade fortemente influenciada pelas condições ambientais é a permeabilidade ao vapor de água que aumenta sensivelmente em altas umidades relativas (KAMPER & FENNEMA, 1984; BIQUET & LABUZA, 1998; RICO-PEÑA & TORRES, 1991). Estudos com biofilmes de glúten condicionados a 5 °C (GONTARD et al., 1993) verificaram um aumento moderado da permeabilidade ao vapor de água com o aumento da umidade relativa. Quando os biofilmes foram condicionados a 30 °C, a permeabilidade aumentou de 1,1 a 50% umidade relativa para 8,2 g.mm/m².mmHg.24 a 93% umidade relativa. Quando os filmes foram condicionados a 50 °C, a permeabilidade apresentou um rápido aumento em baixas umidades relativas até aproximadamente 60% e permaneceu alto e constante.

São diferentes interações entre proteína-água, em solução, provocam as modificações de conformação das proteínas. A água, segundo sua ligação com a proteína pode ser classificada como: (1) Água constitucional, não disponível como solvente, cujas moléculas estão ligadas às proteínas por pontes de hidrogênio, e tem como função

estabilizá-la. Esta água constituinte forma parte da monocamada de BET, adsorvida em sítios específicos da proteína, cadeias laterais polares, através de pontes de hidrogênio ou de interações dipolo-dipolo. (2) A água livre, cujas moléculas estão ligadas entre si em forma de multicamadas em torno da proteína. Além das ligações, pontes de hidrogênio e ligações dipolo-dipolo, as moléculas de hidrogênio estão ligadas por forças de capilaridade. Ao processo de adsorção e absorção destas moléculas de água dá-se o nome de sorção. Devido à característica anfótera da proteína, a água ou outros solventes com afinidade com a proteína miofibrilar estabelecem várias interações atrativas, repulsivas e hidrofóbicas intra e intermoleculares compondo uma matriz tridimensional complexa. Na presença de eletrólitos como cloreto de sódio ocorrem interações alterando suas propriedades funcionais (LIOUTAS et al., 1988). A falta de conhecimento dos mecanismos detalhados destas interações deve-se à complexidade delas.

Segundo KAREL (1975), a migração de água em alimentos ocorre principalmente devido à diferença de pressão de vapor de água, mas outros fatores como gravidade, forças capilares e também o transporte entre as diferentes áreas (p.e. gelo) podem auxiliar. A diferença da pressão de vapor de água entre componentes pode ser reduzida com o uso de plasticizante (p.e. polióis, oligossacarídeos), que fixam as moléculas de água no componente de maior atividade de água (a_w) reduzindo a pressão de vapor (BANKER, 1966). Entretanto, o plasticizante aumenta a mobilidade da cadeia polimérica, gerando então, uma facilidade de absorção de vapor de água.

De acordo com WATT (1983), a absorção de vapor de água pelo biopolímero pode resultar no aumento de volume e mudança de conformação na estrutura molecular. Conseqüentemente, o conhecimento das propriedades de sorção do biofilme a base de proteína é necessário para informar o quanto de água ele pode ganhar ou perder do ambiente ou de um sistema alimentício para, assim, estabelecerem-se as condições adequadas de armazenamento e também para serem previstas as propriedades do filme.

Estudos realizados por LIOUTAS et al. (1984), de sorção de água em proteínas do músculo bovino com adição de sal (NaCl), observaram dois seguimentos distintos, nas curvas de adsorção de umidade, com um aumento da higroscopicidade provocado pela adição de sal, acentuado a partir da a_w 0,75. O mesmo não foi observado por

MONTERREY-QUINTERO (1998) ao estudar proteína miofibrilar de peixe sem adição de sal. Os valores encontrados de umidade de equilíbrio, tanto nas curvas de absorção como nas de dessorção foram contínuos e não apresentaram um aumento acelerado a partir de valores próximos a a_w 0,75. Uma baixa higroscopicidade foi constatada por MONTERREY-QUINTERO (1998) em proteínas miofibrilares de peixe, extraídas pelo método de trituração seguido de sucessivas lavagens. Foram observados valores de umidades de equilíbrio inferiores a 20% (b.s), em atividades de água abaixo de 0,75, às temperaturas de 15, 25 e 35 °C. Esta característica apresenta um efeito benéfico, que as tornam interessantes para a produção de biofilmes poucos higroscópicos, mas por outro lado, o filme produzido a partir da proteína extraída pelo processo de lavagens sucessivas apresentou uma quantidade considerável de orifícios observados na fotografia eletrônica de varredura (MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, 2000).

Em base ao anteriormente exposto, o objetivo deste trabalho foi o de verificar o efeito da adição do plasticizante sobre as isotermas de adsorção de umidade do filme a base de proteína miofibrilar a 10, 25 e 35 °C e comparar os valores obtidos com a isoterma da proteína liofilizada a 25 °C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE

Utilizou-se o músculo *Semitendinosus*, e a extração procedeu de acordo com **Cap. 2**, item 2.1. As proteínas miofibrilares foram extraídas do músculo no estado *pós-rigor* e armazenadas, seguindo-se o método modificado de EISELE & BREKKE (1981), discutido no **Cap. 2**, item 2.1.

2.2 FORMAÇÃO DO FILME

A elaboração dos filmes, segundo o método “casting”, consistiu inicialmente na formação de uma solução coloidal, seguida de secagem, procedimento descrito previamente

nos **Cap.2** e **3**. Segundo o estudo exposto no **Cap. 3**, o filme de melhores propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água foi o elaborado com a solução de “casting” de concentração de glicerol 60% (g glicerol/g proteína), concentração de proteína 1%, pH 2,8 e temperatura do tratamento térmico de 50 °C, durante 45 minutos, portanto, escolhida para este estudo de sorção.

A solução filmogênica foi colocada em suporte, e seca em estufa de ventilação forçada (Modelo 320-SE) em temperatura de 37 °C por 18 horas.

2.3 ISOTERMAS DE SORÇÃO DE ÁGUA

As amostras de proteínas miofibrilares liofilizadas e de biofilmes foram colocadas em dessecadores com P₂O₅ por 15 dias, a 25 °C para obtenção de amostras desidratadas. Os biofilmes foram cortados em pequenos pedaços (aproximadamente 2 x 2 cm). Em seguida as amostras de proteínas e de biofilmes foram acondicionadas em ambientes com diferentes umidades relativas conhecidas (Anexo C), estabelecidas de acordo com o procedimento recomendado no projeto COST-90 (SPIESS & WOLF, 1983). As amostras de biofilmes e proteínas foram condicionadas em temperaturas controladas de 10, 25 e 35 °C e 25 °C, respectivamente.

Uma vez alcançado o equilíbrio, num período aproximado de 20 dias, determinou-se o teor de umidade das amostras em estufa de ventilação forçada (Modelo 320-SE) a 100 °C/24 h. Os testes de adsorção foram feitos em triplicatas.

2.4 MODELOS DE ISOTERMA DE ADSORÇÃO

Os modelos de GAB (1938), BET (1984), HENDERSON & OSWIN, *apud* PARK & NOGUEIRA (1992) e HALSEY (1948) mostrados na Tabela (6.1), foram ajustados aos dados experimentais para as análises de regressão não linear com o programa Origin 3.5 (Software Microcal Origin®), para estimar as constantes dos modelos.

Para avaliar a qualidade de ajuste de cada equação, calculou-se o desvio relativo médio (E) (AGUERRE et al., 1989). Este módulo é definido pela Equação (6.1).

$$E \% = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{m_i - m_{pi}}{m_i} \right| \quad 6.1$$

Tabela 6.1 - Modelos para ajustar as isotermas de adsorção de filmes comestíveis a base de proteína miofibrilar.

Nome do Modelo	Modelo
GAB	$X = \frac{x_m \cdot c \cdot k \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w) (1 - k \cdot a_w + c \cdot k \cdot a_w)}$
BET	$X = \frac{x_m \cdot c \cdot a_w}{1 + a_w (c - 1) (1 - a_w)}$
HENDERSON	$X = 0,01 \cdot \left[\frac{-1}{b \cdot T} \cdot \ln (1 - a_w) \right]^{\frac{1}{C}}$
OSWIN	$X = m \cdot \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^r$
HALSEY	$X = \left(\frac{-b}{8,314 \cdot T} \cdot \frac{1}{\ln (a_w)} \right)^{\frac{1}{C}}$

b, c, k e m são constantes dos modelos de isoterma de sorção; X_m - teor de umidade da monocamada (base seca); X - teor de umidade (base seca); R - constante dos gases perfeitos (kcal/mol.K); T - temperatura absoluta (K) e k - constante de Guggenheim.

onde m_i e m_{pi} são os valores experimentais e preditos, respectivamente, e n é o número de observações dos dados experimentais. Geralmente considera-se que um valor de E inferior a 5% indica um razoável ajuste para propósitos práticos (AGUERRE et al., 1993).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados experimentais e preditos de adsorção de umidade de filmes a base de proteína miofibrilar de carne bovina, a 10, 25 e 35 °C e de proteína miofibrilar de carne bovina a 25 °C, se encontram tabelados no Anexo (C). Na Figura (6.1 e 6.2), foram plotadas

as umidade de equilíbrios de adsorção em função de a_w . Observa-se que em temperaturas mais elevadas, a quantidade de água retida para uma mesma a_w é menor, como esperado. Este comportamento de isoterma, no caso de adsorção, está exaustivamente discutido na literatura. As isotermas de adsorção, de proteínas miofibrilares e dos biofilmes produzidos a partir das mesmas, apresentaram a forma similar à sigmoïdal, como de polímeros sensíveis ao vapor de água (LIOUTAS et al., 1988), e de biofilmes a base destes polímeros (MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, não-publicado; CUQ et al., 1997). Geralmente, sistemas com alto teor protéico apresentam maior incidência na forma sigmoïdal como as proteínas de trigo (GONTARD et al., 1993; GENNADIOS & WELLER, 1994), mas p.e. filme a base de celulose (MANJEET & PARK, 1995), também apresentou isoterma na forma sigmoïdal.

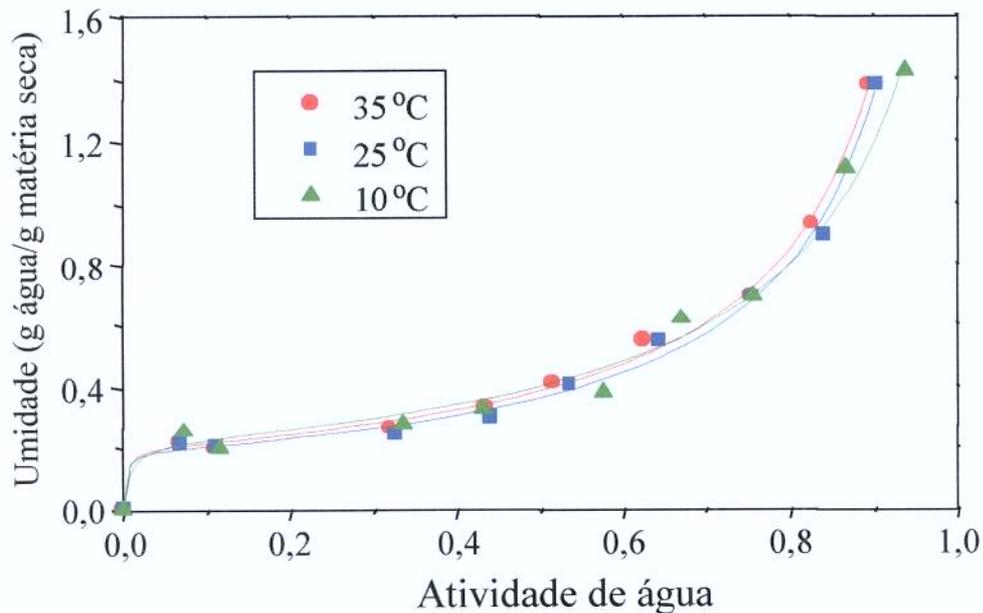


Figura 6.1 - Isotermas de adsorção a 10, 25 e 35 °C, do filme ($C_g=60\%$, $pH=2,8$ e $T=50$ °C) a base de proteína miofibrilar 1%. Nas temperaturas de condicionamento: \blacktriangle , 10 °C; \blacksquare , 25 °C; \bullet , 35 °C. Linha cheia-ajuste GAB.

Os modelos matemáticos utilizados ajustaram os resultados em toda faixa de a_w estudada (GAB, BET, HENDERSON, OSWIN e HALSEY). As constantes calculadas

pelos modelos e seus respectivos erros padrão, os coeficientes de correlação e de correlação explicada e o desvio médio relativo de erro, para as proteínas miofibrilares liofilizadas e os filmes a base destas são mostrados nas Tabelas (6.2,3,4,5). Observa-se que os valores obtidos por regressão, de R^2 , próximos à unidade da equação de GAB e HALSEY confirmam o melhor ajuste dos modelos. Os ajustes calculados pelos modelos de GAB e HALSEY das proteínas miofibrilares liofilizadas à 25 °C foram respectivamente, $E\% = 4,12$ e $3,22$ e para os biofilmes a base das mesmas proteínas, à 10 e 25 °C, os valores de E foram $1,31$ e $3,22\%$; $0,90$ e $0,96\%$, respectivamente. Entretanto, o valor da constante c (132,7596) e o seu erro (359,1179), no modelo de GAB apresentaram-se elevados.

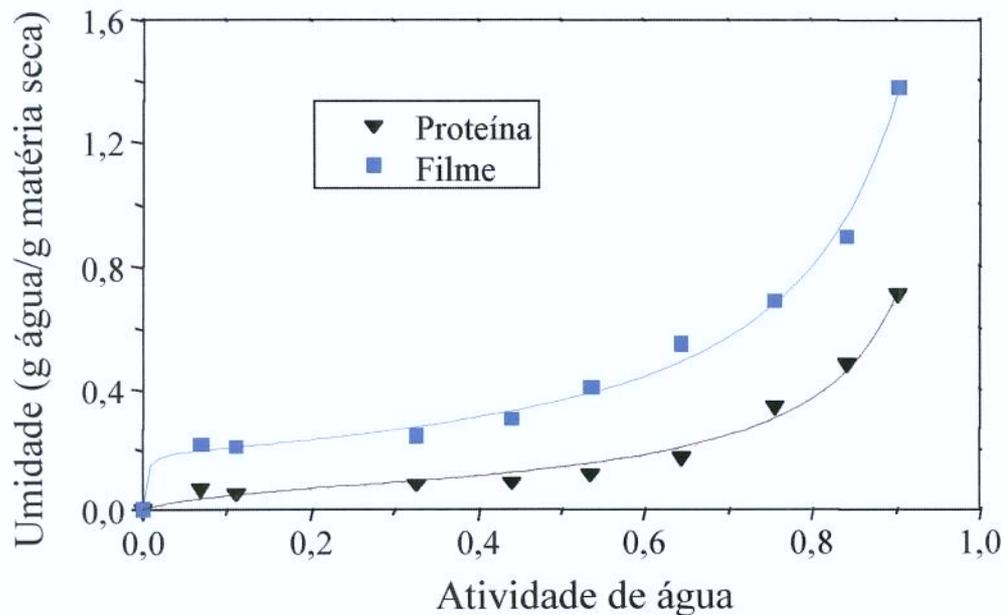


Figura 6.2 - Isotermas de adsorção a 25 °C, de filme ($C_g=60\%$, $pH=2,8$ e $T=50$ °C) a base de proteína miofibrilar 1% e da proteína miofibrilar de origem bovina liofilizada: ▼, filme; ■, proteína e Linha cheia-GAB.

O teor de umidade da monocamada das proteínas miofibrilares de origem bovina, da equação de GAB foi $X_m = 0,078$ a 25 °C, aproximadamente 15% acima do observado para proteínas miofibrilares de peixe e de sardinha do Atlântico. Ainda que a diferença possa

estar associada à habilidade de ajuste da própria equação de GAB (LEWICKI, 1997) é de se esperar que o filme de proteína bovina adsorva mais água que o de Tilápia do Nilo. Isto pode estar associado ao resíduo de sal retido durante o processo de extração das proteínas miofibrilares de origem bovina, extraídas por centrifugação diferencial em soluções salinas (LIOUTAS et al., 1988). Outra explicação possível é a provável alteração estrutural das proteínas durante a extração, e conseqüente exposição de resíduos polares das macromoléculas, os quais tornam acessíveis as moléculas de água. Comparando o percentual de aminoácidos que interagem com a água formando pontes de hidrogênio das proteínas miofibrilares (53,1%) e de Tilápia do Nilo (45,9%) (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000), pode-se observar um valor bem acima, sugerindo uma maior interação com as moléculas de água. Este resultado está de acordo com LIOUTAS et al. (1984, 1988) ao determinarem curvas de adsorção de mistura de proteína e NaCl, a 5 °C. O fato foi principalmente atribuído pelo autor ao sal que pode ligar a uma pequena quantidade de água em a_w abaixo de 0,75, enquanto que acima desta a_w o sal começa a diminuir sua capacidade de ligar água, aumentando a quantidade de água livre. Neste caso, a temperatura tem um efeito adicional sobre a quantidade de água adsorvida em a_w acima de 0,75. Acima de 70% o teor de umidade de equilíbrio de adsorção tem um aumento rápido (Figura 6.2).

Neste caso, a temperatura tem um efeito adicional sobre a quantidade de água adsorvida em a_w acima de 0,75. Acima de 70% o teor de umidade de equilíbrio de adsorção tem um aumento rápido (Figura 6.2). No caso dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de carne bovina, os valores de umidade de monocamada foram $X_m = 0,22$; 0,19 e 0,20 nas temperaturas de 10, 25 e 35 °C, respectivamente, sendo maiores em relação aos observados para a proteína liofilizada de origem bovina.

Todavia, entre os biofilmes, observa-se nos valores obtidos da equação de GAB, que o teor de umidade da monocamada (X_m) diminui, à medida que a temperatura aumenta (Tabela 6.3,4,5). Esta é uma tendência geralmente verificada em biofilmes. Além disto, se a quantidade de água adsorvida em cada a_w decresce com o aumento da temperatura, significa que apresenta comportamento de acordo com a equação de Clausius Clapeyron. Na Figura (6.1) observa-se o efeito negligenciável da temperatura, onde se nota uma ligeira diferença entre a quantidade de água adsorvida no biofilme em função da temperatura.

TABELA 6.2 – Parâmetros dos modelos de GAB, BET, HENDERSON, OSWIN e HALSEY com seus respectivos erros, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (R) e o desvio relativo médio (E), calculados pelo ajuste das isotermas de adsorção da proteína miofibrilar de origem bovina, a temperatura de 25 °C.

Modelo	Parâmetros do modelo-Erro			R^2	R	E%
GAB	X_m	c	k	0,9853	0,9926	4,12
	0,0786-0,0098	9,3923-9,7801	0,9866-0,0153			
BET	X_m	c		0,9810	0,9905	3,21
	0,0733-0,0029	13,0708-14,7775				
HENDERSON	b	C		0,9753	0,9876	4,28
	0,0005-0,0001	0,6421-0,0609				
OSWIN	m	r		0,9818	0,9908	4,18
	0,1275-0,0136	0,7860-0,0567				
HALSEY	b	c		0,9847	0,9923	3,22
	182,8341-10,5446	1,1061-0,0690				

Na Figura (6.2) se compara o teor de umidade de equilíbrio de adsorção da proteína miofibrilar com o de biofilmes a base de proteína miofibrilar. Nota-se que um comportamento bem diferente dos dois materiais. Nos filmes foram obtidos isotermas tipo II, na classificação de Brunauer, e na proteína, tipo III, identificando no primeiro caso altos valores de calor de sorção da monocamada.

Observa-se que o biofilme apresenta mais sensibilidade à umidade relativa, adsorvendo mais água para uma mesma temperatura. Este comportamento deve-se ao efeito cumulativo das condições de processamento e da quantidade de plasticizante adicionado ao filme (60 %, g glicerol/g proteína). A proteína miofibrilar bovina é menos higroscópica que o filme, 50%, comportamento que se verifica em toda extensão das curvas.

O desdobramento, mesmo que parcial das moléculas de proteína, provocado pela adição de ácido ou pelo tratamento térmico dado a solução formadora de filme indica uma

tendência de expor os grupos polares das cadeias laterais, que permitem maior número de ligações entre a proteína-água e a proteína-plasticizante. Este fato explica os diferentes comportamentos de sorção entre a proteína miofibrilar liofilizada e o biofilme. GONTARD et al. (1993) cita estas diferenças e as relaciona às mudanças de conformação da proteína durante a formação do filme, e também devido à alta hidrofiliçidade do plasticizante incorporado na rede protéica.

Tabela 6.3 – Parâmetros dos modelos de GAB, BET, HENDERSON, OSWIN e HALSEY com seus respectivos erros padrão, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (R) e o desvio relativo médio (E), calculados pelo ajuste das isotermas de adsorção dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina, a temperatura de 10 °C.

Modelo	Parâmetros do modelo-Erro			R^2	R	E%
GAB	X_m	c	k	0,9987	0,9933	1,31
	0,2185-0,0170	132,7596-359,1179	0,9039-0,0148			
BET	X_m	c		0,9810	0,9905	1,90
	$3,89 \cdot 10^{16}$ -0,0082	13,7077-14,7776				
HENDERSON	b	C		0,9802	0,9844	4,18
	0-0	0,9226-0,0918				
OSWIN	m	r		0,9859	0,9929	0,46
	0,3941-0,0242	0,5862-0,0351				
HALSEY	b	c		0,9888	0,9944	3,22
	425,0956-14,563914	1,4447-0,0742				

Os valores obtidos de umidades de equilíbrio dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina apresentaram maiores que os de biofilmes a base de tilápia do Nilo e sardinha do Atlântico (MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL, não publicado; CUQ et al., 1997), respectivamente, em todo intervalo de umidade relativa. A diferença de

umidade de equilíbrio entre as proteínas miofibrilares de origem bovina e de peixe deve-se ao processo de extração e também ao tratamento de congelamento dado às amostras, além de origens diversas. As proteínas miofibrilares de origem bovina possuem uma estrutura de alta densidade de energia resultado das ligações dissulfídicas (-S-S-), 13,26%. Por outro lado, o processo de congelamento lento, comparado ao rápido aplicado nas proteínas de peixe, permite a formação dessa rede de alta densidade energética e de estrutura porosa, que melhor retém relativamente as moléculas de água e de plasticizante. Enquanto as proteínas miofibrilares de peixe possuem uma rede densa devido ao congelamento, porém de menor potencial energético e de menor retenção das moléculas de água e de plasticizante.

Tabela 6.4 – Parâmetros dos modelos de GAB, BET, HENDERSON, OSWIN e HALSEY com seus respectivos erros padrão, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (R) e o desvio relativo médio (E), calculados pelo ajuste das isotermas de adsorção dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina, a temperatura de 25 °C.

Modelo	Parâmetros do modelo-Erro			R^2	R	E%
GAB	X_m	c	k	0,9929	0,9964	0,90
	0,1878-0,0084	376,818	0,9526-0,0086			
BET	X_m	c		0,9619	0,9807	1,62
	0,1468-0,0062	$3,62 \cdot 10^{15}$ - $1,06 \cdot 10^{59}$				
HENDERSON	b	C		0,9527	0,9761	1,92
	0-0	0,9340-0,1139				
OSWIN	m	r		0,9830	0,9914	3,49
	0,3653-0,0246	0,5856-0,0380				
HALSEY	b	c		0,9925	0,9962	0,96
	401,0817-11,159	1,4427-0,0596				

Tabela 6.5 – Parâmetros dos modelos de GAB, BET, HENDERSON, OSWIN e HALSEY com seus respectivos erros padrão, coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (R) e o desvio relativo médio (E), calculados pelo ajuste das isotermas de adsorção dos biofilmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina, a temperatura de 35 °C.

Modelo	Parâmetros do modelo-Erro			R^2	R	E%
GAB	X_m	c	k	0,9965	0,9950	1,14
	0,2004-0,0078	295,9723-830,1347	0,9517-00761			
BET	X_m	c		0,9556	0,9775	2,14
	0,1484-0,0152	$5,35 \cdot 10^{48} - 7,50 \cdot 10^{60}$				
HENDERSON	b	C		0,9581	0,9788	2,00
	0-0	0,9660-0,1101				
OSWIN	m	r		0,9889	0,9944	3,69
	0,3806-0,0199	0,5697-0,0297				
HALSEY	b	c		0,9976	0,9988	1,37
	423,1201-6,6069	1,4775-0,0338				

4. CONCLUSÃO

As isotermas de proteínas miofibrilares e de filmes a base de proteínas miofibrilares apresentaram comportamentos tipo II e III.

Os resultados apresentados de temperatura provocaram o efeito esperado sobre as isotermas, mas a diferença entre as isotermas de 10, 25 e 35 °C foi negligenciável.

Este estudo demonstrou que o modelo GAB pode representar os dados experimentais de biofilmes a base proteína miofibrilar entre a_w de 0,070 e 0,907.

A diferença entre as isotermas de biofilme e proteína está relacionada com a maior capacidade de adsorção, devido a presença do plasticizante na composição e também às possíveis modificações ocorridas na estrutura molecular da proteína.

5. BIBLIOGRAFIA

- AGUERRE, R.J.; SUAREZ, C.; VIOLLAZ, P.E. New BET type multilayer sorption isotherms. Part II: modeling water sorption in foods. **Lebensmittel - Wissenschaft Technoligil.** v.22, n.4, p.192-195, ago./set.1989.
- AGUERRE, R.J.; SUAREZ, C.; VIOLLAZ, P.E. Modeling temperature dependence of food sorption isotherms. **Lebensmittel - Wissenschaft Technoligil.** v.22, n.1, p.1-5, jan./feb.1993.
- BANKER, G.S. Film coating theory and practice. **Journal Pharmaceutical.** v.55, p.81-89, 1966.
- BIQUET, B.; LABUZA, T.P. Evaluation of the moisture permeability characteristics of chocolate films as an edible moisture barrier. **Journal of Food Science.** v.53, n.4, p.989-997, jul./ago. 1998.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; AYMARD, C.; GUILBERT, S. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar proteins-based films. **Polymer Gels and Networks.** v.5, p.1-15, 1997.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. **Journal of Agricultural Food Chemistry.** v.45, n.3, p.622-626, 1997.
- EISELE, T.A.; BREKKE, C.J. Chemical and modification and functional properties of acylated beef heart myofibrillar proteins. **Journal of Food Science.** v.46, n.4, p.1095-1102, jul./ago. 1981.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Moisture adsorption by grain protein films. **American Society of Agricultural Engineers.** v.37, n.2, p.535-539, 1994.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; GOODING, C.H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. **Journal of Food Engineering.** v.21, n.3, p.395-409, abr. 1994.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J.L. Water and glicerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science.** v.58, n.1, p.206-211, jan./fev. 1993.
- HALSEY, G. Physical adsorption of non-uniform surfaces. **Journal Chemistry Physical.** v.16, p.931-937, 1948.
- KAMPER, S.L.; FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible bilayer films. **Journal of Food Science.** v.49, p.1478-1481, 1984.
- KAREL, M. Effect of water activity and food preservation. In: **Principles of food science.** M. KAREL; O.R. FENNEMA and D.B. LUD, Eds., Marcel Dekker, New York, 1975.

- LEWISK, P.P. Water sorption isotherms and their estimation in food model mechanical mixtures. **Journal of Food Engineering.** v.32, p.47-68, 1997.
- LIOUTAS, T.S.; BAIANU, I.C.; BECHTEL, P.J.; STEINBERG, M.P. Oxygen-17 and sodium-23 nuclear magnetic resonance studies of myofibrillar protein interactions with water and electrolytes in relation to sorption isotherms. **Journal Agricultural of Food Chemistry.** v.29, n.2, p.437-444, abr.1984.
- LIOUTAS, T.S.; BECHTEL, P.J.; STEINBERG, M.P. Desorption and adsorption isotherms of meat-salt mixture. **Journal Agricultural of Food Chemistry.** v.32, n.6, p.1382-1385, nov./dez. 1988.
- MANJEET, S.C.; H PARK.J. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. **Journal of Food Process Engineering.** v.18, n.4, p.417-429, jul./ago. 1995.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S. **Caracterização físico-química de proteínas miofibrilares e elaboração de biofilmes.** Tese de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 1998.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Sorption isotherms of edible films of tilapia myofibrillar proteins. Submetido a publicação.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-Nilo para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v.35, n.1, p.179-189, jan. 2000.
- RICO-PEÑA, D.C.; TORRES, J.A. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. **Journal Food Science.** v.56, p.497-499, 1991.
- SPIESS, W.E.L.; WOLF, W.R. The results of the COST 90 Project on water activity. In: JOWITT, R.; ESCHER, F.; HALLSTRÖM, B.; MEFFERT, H.F.T.; SPIESS, W.E.L.; VOS, G. **Physical Properties of Foods.** Applied Science Publishers, London and New York, 1983, p.65-87.
- WATT, I.C. The theory of water sorption by biological materials. In: **Physical Properties of Foods**, sds. R. Jowitt, F. Escher, B. Hallström, H.F.T. Meffert, W.E.L. Spiess e G. Vos. Londres, Inglaterra. ed. Applied Science Publishers, p. 27-41, 1983.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO GERAL

- O método de extração por centrifugação diferencial com solução tampão fosfato de sódio a diferentes concentrações de NaCl apresentou um bom rendimento, em torno de 46%, considerando o tipo de músculo utilizado.
- A escolha do estado da carne *pós-rigor mortis*, para extração da proteína foi oportuna, considerando a fonte comercial da matéria-prima, e também por possibilitar comparação com proteínas miofibrilares de peixe extraídas no estado *pré-rigor mortis*.
- As proteínas extraídas de músculo *Semitendinosus* bovino apresentaram teores de proteínas de 84,26% e baixo teor de gordura em função do processo de extração.
- As identificações das frações protéicas e dos aminoácidos constituintes de proteínas miofibrilares extraídas de músculo bovino *pós-rigor mortis* foram semelhantes às das proteínas miofibrilares de tilápia do nilo adulta extraídas de músculo *pré-rigor mortis*, exceto a actina que apresentou faixa de peso molecular maior.
- As proteínas miofibrilares são capazes de formar filmes de baixa solubilidade, de transparência relativa e de fácil manuseio.
- Os filmes apresentaram boas propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água.
- Os biofilmes apresentaram duas texturas, uma de aparência fina e outra de materiais insolúveis, além de fendas que foram atribuídas a locais onde se encontravam as frações de água e glicerol ou água, que foram evaporadas durante a secagem a vácuo das amostras, uma etapa da metodologia.
- Os biofilmes apresentaram duas Tg's distintas. A primeira Tg representa a fração rica em glicerina e a segunda Tg constituída da fração menos solúvel de proteína. Estes resultados permitem concluir que filmes comestíveis a base de proteína miofibrilar bovina não são um sistema homogêneo real. A maior Tg do sistema ficou abaixo da temperatura ambiente. Isto torna possível seu manuseio e aplicação.
- A natureza hidrofílica da macromolécula é um limitante do potencial destes biofilmes.

- A adição de plasticizante à proteína, no caso o filme, aumentou a adsorção de água.
- Os biofilmes apresentaram baixa solubilidade em água, uma propriedade que pode torná-los utilizáveis como embalagens de alimentos de alto teor de umidade.
- Os filmes após uma estocagem de 24 meses não apresentaram sinais visíveis de deterioração.

SUGESTÕES

- Determinar a temperatura de transição vítrea das proteínas miofibrilares de origem bovina.
- Determinar o coeficiente de permeabilidade dos biofilmes aos gases O₂ e CO₂.
- Estudar a influência de adição de substâncias hidrófobas nos filmes a base de proteínas miofibrilares de origem bovina e o seu efeito sobre a permeabilidade ao vapor de água, bem como das propriedades mecânicas.
- Desenvolver uma formulação a partir de proteínas miofibrilares extraídas de forma análoga a de surimi (em água), e estudar o desenvolvimento de cor desses filmes.
- Estudar a característica de biodegradabilidade vs o potencial de aplicações desses filmes como embalagens com relação às condições de armazenamento, contaminação microbiana e de insetos.
- Estudar aplicações práticas como revestimentos em frutas (p.e.: banana, goiaba, maçã...) e raízes.

ANEXO A

Tabela A.1 - Efeito dos fatores sobre a força de ruptura calculados para o planejamento fatorial completo 2³.

Modelo	Fator	Efeitos (N)	Erro Padrão	p
Linear	Média	2,27*	0,21*	0,0016*
	Cg	-0,21	0,22	0,4434
	pH	-0,58	0,22	0,0823
	T	-0,33	0,22	0,2361
Interações	Cg x pH	0,06	0,29	0,8390
	Cg x T	-0,05	0,29	0,8634
	pH x T	0,23	0,29	0,4821
Quadrático	Cg x Cg	-0,11	0,23	0,6581
	pH x pH	-0,41	0,23	0,1876
	T x T	-0,33	0,23	0,0808

*Nível de significância p<0,05%.

Tabela A.2 - Efeito dos fatores sobre a deformação de ruptura calculados para o planejamento fatorial completo 2³.

Modelo	Fator	Efeitos (mm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	8,96*	0,16*	0,000012*
	Cg	0,35	0,17	0,1310
	pH	0,43	0,17	0,0875
	T	0,22	0,17	0,2793
Interações	Cg x pH	-1,32*	0,22*	0,0098*
	Cg x T	-0,90*	0,22*	0,0277*
	pH x T	0,48	0,22	0,1191
Quadrático	Cg x Cg	0,00	0,17	0,9868
	pH x pH	0,54	0,17	0,0553
	T x T	-0,90	0,17	0,3774

*Nível de significância p<0,05%.

Tabela A.3 - Efeito dos fatores sobre a solubilidade calculados para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Modelo	Fator	Efeitos (%)	Erro Padrão	p
Linear	Média	25,06*	0,22*	0,000002*
	Cg	-4,19*	0,24*	0,00042*
	pH	-2,55*	0,24*	0,00181*
	T	-5,70*	0,24*	0,00017*
Interações	Cg x pH	-2,09*	0,32*	0,0070*
	Cg x T	2,03*	0,32*	0,00701*
	pH x T	-0,11	0,32	0,00767
Quadrático	Cg x Cg	-1,18*	0,25*	0,018172*
	pH x pH	-6,55*	0,25*	0,000124*
	T x T	-11,18*	0,25*	0,000025*

*Nível de significância $p < 0,05\%$.Tabela A.4 - Efeito dos fatores sobre a opacidade calculados para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Modelo	Fator	Efeitos (Ua.mm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	121,46*	12,33*	0,0022*
	Cg	11,58	13,37	0,4498
	pH	50,41*	13,37*	0,0326*
	T	-3,31	13,37	0,8206
Interações	Cg x pH	-6,83	17,46	0,7218
	Cg x T	-11,14	17,46	0,5690
	pH x T	-10,42	17,46	0,5928
Quadrático	Cg x Cg	40,31	13,88	0,0624
	pH x pH	12,42	13,88	0,4372
	T x T	-3,71	13,88	0,8073

*Nível de significância $p < 0,05\%$.

Tabela A.5 - Efeito dos fatores sobre a permeabilidade ao vapor de água calculados para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Modelo	Fator	Efeitos (10^{-10}) (mol.m/s.m ² .Pa)	Erro Padrão	p
Linear	Média	0,25*	0,0139*	0,0004*
	Cg	0,02	0,0151	0,3699
	pH	-0,08*	0,0151*	0,0111*
	T	0,00	0,0151	0,8880
Interações	Cg x pH	-0,02	0,0157	0,0185
	Cg x T	-0,14*	0,0157*	0,0089*
	PH x T	0,09*	0,0157*	0,0050*
Quadrático	Cg x Cg	0,07*	0,0197*	0,3810*
	pH x pH	0,10*	0,0197*	0,0062*
	T x T	0,11*	0,0197*	0,0185*

*Nível de significância $p < 0,05\%$.

Tabela A.6 - Coeficientes de regressão da força de ruptura calculados pelo planejamento fatorial completo 2^3 .

Modelo	Fator	Coeficiente (N)	Erro Padrão	p
Linear	Média	2,21*	0,16	0,000893
	Cg	-0,10	0,11	0,443489
	pH	-0,29	0,11	0,082366
	T	-0,17	0,11	0,236170
Interações	Cg x pH	-0,03	0,14	0,839062
	Cg x T	-0,02	0,14	0,863407
	PH x T	-0,12	0,14	0,482147
Quadrático	Cg x Cg	-0,06	0,12	0,658088
	pH x pH	-0,20	0,12	0,2000754
	T x T	-0,30	0,12	0,084136

*Nível de significância $p < 0,05\%$.Tabela A.7 – Coeficientes de regressão na deformação de ruptura calculados pelo planejamento fatorial completo 2^3 .

Modelo	Fator	Coeficientes (mm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	9,09*	0,16	0,000012
	Cg	0,18	0,08	0,131068
	pH	0,21	0,08	0,087534
	T	0,11	0,08	0,279326
Interações	Cg x pH	-0,66*	0,11	0,009774
	Cg x T	-0,45	0,11	0,027734
	pH x T	0,24*	0,11	0,119163
Quadrático	Cg x Cg	0,00	0,08	0,986882
	pH x pH	0,27	0,08	0,055327
	T x T	-0,09	0,08	0,377457

*Nível de significância $p < 0,05\%$.

Tabela A.8 – Coeficientes de regressão da solubilidade calculados pelo planejamento fatorial completo 2³.

Modelo	Fator	Coeficiente (%)	Erro Padrão	p
Linear	Média	25,06*	0,22	0,000002
	Cg	-2,09*	0,12	0,00042
	pH	-1,27*	0,12	0,001819
	T	-2,83*	0,12	0,000171
Interações	Cg x pH	-2,09*	0,16	0,007017
	Cg x T	2,02*	0,16	0,007675
	pH x T	-0,89	0,16	0,065657
Quadrático	Cg x Cg	-0,59*	0,12	0,018172
	pH x pH	-3,27*	0,12	0,000124
	T x T	-5,59*	0,12	0,000025

*Nível de significância p<0,05%.

Tabela A.9 – Coeficientes de regressão da opacidade calculados pelo planejamento fatorial completo 2³.

Modelo	Fator	Coeficiente (Ua.mm)	Erro Padrão	p
Linear	Média	125,34*	7,72*	0,000509*
	Cg	5,79	6,68	0,449786
	pH	25,20*	6,68*	0,032659*
	T	-1,6	6,68	0,820616
Interações	Cg x pH	-3,41	8,73	0,721864
	Cg x T	-5,57	8,73	0,569084
	pH x T	-5,21	8,73	0,592780
Quadrático	Cg x Cg	19,40*	6,68*	0,06247*
	pH x pH	6,20	6,94	0,437191
	T x T		6,94	0,807302

*Nível de significância p<0,05%.

Tabela A.10 – Coeficientes de regressão da permeabilidade ao vapor de água calculados pelo planejamento fatorial completo 2^3 .

Modelo	Fator	Coeficiente (10^{-10}) (mol.m/s.m ² .Pa)	Erro Padrão	p
Linear	Média	1,60*	0,09*	0,000398*
	Cg	0,05	0,05	0,372062
	pH	-0,27*	0,05*	0,011493*
Interações	T	0,01	0,05	0,86428
	Cg x pH	-0,06	0,06	0,387869
	Cg x T	-0,44*	0,06*	0,006553*
Quadrático	PH x T	0,30*	0,06*	0,01918*
	Cg x Cg	0,24*	0,05*	0,019042*
	pH x pH	0,31*	0,05*	0,009114*
	T x T	0,37*	0,05*	0,005212*

*Nível de significância $p < 0,05\%$.

ANEXO B

A permeabilidade ao vapor de água (P) dos biofilmes foi calculada utilizando a Equação (1.2) no item 1.4 do **Cap.1**.

$$\text{Permeabilidade} = \frac{g}{t} \cdot \frac{x}{A \cdot (\Delta p)} \quad (1.2)$$

Onde x é a espessura dos biofilmes, A é a área de permeação, Δp é a diferença de pressão de vapor ambiente contendo sílica gel (0% UR; 0 mmHg pressão de vapor de água) e da água (100% UR; 32,33 mmHg pressão vapor da água, a 25 °C) ou de soluções salinas de diferentes pressão de vapor.

Na Figura (B.1) mostra o gráfico esquemático de ganho de umidade *versus* tempo, quando a transferência de vapor de água através do filme atingiu o estado estacionário. Então, determina-se o termo g/t ou o coeficiente angular da curva traçada ($y = a + bx$).

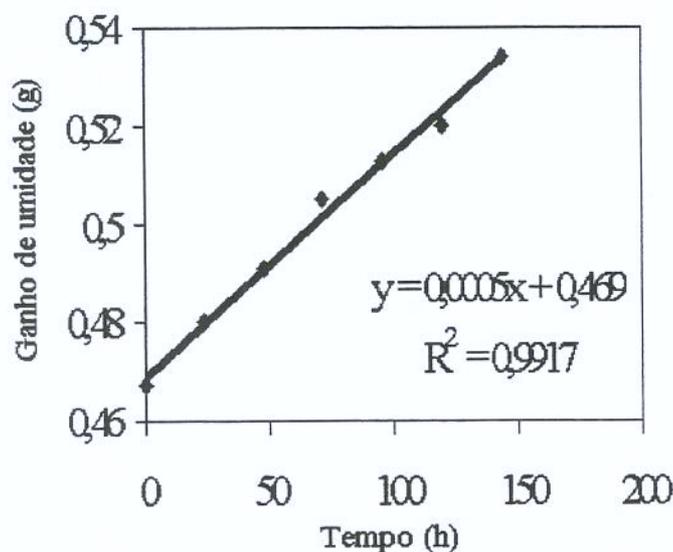


Figura B.1 – Representação do gráfico para calcular o termo ganho de peso da amostra de filme em função do tempo (g/t), quando o fluxo de vapor de água atingiu o estado estacionário.

O termo g/t = coeficiente angular da parte linear da curva, ganho de umidade *versus* tempo, em g de água/hora.

Ao considerar a área (A) de permeação do filme determina-se a taxa de permeação ($g/t.A$), em g de água/hora.m².

ANEXO C

A Equação (4.1) foi utilizada no cálculo percentual (%) de deformação na ruptura dos biofilmes. A Figura (C.1) mostra o esquema de determinação das propriedades mecânicas, especificamente a deformação na ruptura dos biofilmes e as condições em que ocorre a deformação dos biofilmes perfurados pela sonda.

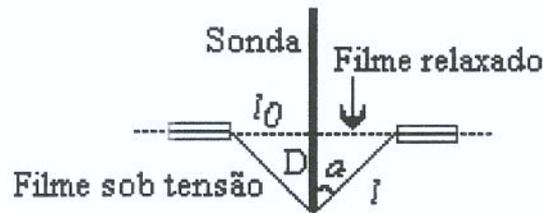


Figura C.1 – Esquema do sistema de determinação do teste deformação na ruptura.

Onde l_0 é o raio da superfície exposta do filme a ser testado, D é a distância penetrada pela sonda na ruptura, l é o novo raio da superfície do biofilme no ponto de ruptura.

Da Figura (C.1), obtemos a relação matemática:

$$\cos \alpha = \frac{D}{l} = \frac{D}{\sqrt{D^2 + l_0^2}}$$

$$\frac{D}{l} = \frac{D}{\sqrt{D^2 + l_0^2}}$$

No ponto de ruptura o raio da superfície (l_0) tem um aumento Δl . Substituindo l por $(l_0 + \Delta l)$, tem-se a Equação utilizada para o cálculo da deformação na ruptura.

$$\frac{\Delta l}{l_0} = \left(\frac{\sqrt{D^2 + l_0^2} - l_0}{l_0} \right) \cdot 100$$

ANEXO D

Tabela D.1 - Umidades relativas de soluções salinas saturadas.

Sal	Temperatura (°C)		
	10	25	35
NaOH	0,073	0,069	0,068
LiCl	0,115	0,112	0,111
MgCl ₂	0,337	0,327	0,321
K ₂ CO ₃	0,433	0,442	0,436
Mg(NO ₃) ₂	0,577	0,536	0,516
NaNO ₂	0,671	0,645	0,625
NaCl	0,758	0,756	0,755
KCl	0,870	0,843	0,827
BaCl ₂	0,940	0,904	0,897

Fonte: ROOS (1995).

Tabela D.2 – Teor de umidade de equilíbrio de adsorção experimental e desvio padrão, e os estimados pelo modelo matemático de GAB, em base seca e seus respectivos valores de a_w para a proteína liofilizada, a 25 °C.

Solução Salina	a_w	X (b.s.) Adsorção		
		Experimental	Desvio Padrão	Estimados - GAB*
NaOH	0,069	0,071	0,0004	0,034
LiCl	0,112	0,054	0,0020	0,047
MgCl ₂	0,327	0,085	0,0007	0,095
K ₂ CO ₃	0,442	0,093	0,0041	0,122
Mg(NO ₃) ₂	0,536	0,117	0,0027	0,152
NaNO ₂	0,645	0,173	0,0024	0,204
NaCl	0,756	0,338	0,0024	0,298
KCl	0,843	0,481	0,0143	0,457
BaCl ₂	0,904	0,706	0,0054	0,717

*(p<0,05)

Tabela D.3 – Teor de umidade de equilíbrio de adsorção experimental e desvio padrão, e os estimados pelo modelo matemático de GAB, em base seca e seus respectivos valores de a_w para a formulação ótima, a 10 °C.

Solução Salina	a_w	X (b.s.) Adsorção		
		Experimental	Desvio Padrão	Estimados - GAB*
NaOH	0,073	0,251	0,0164	0,211
LiCl	0,115	0,196	0,0044	0,229
MgCl ₂	0,337	0,272	0,0169	0,309
K ₂ CO ₃	0,433	0,320	0,0162	0,355
Mg(NO ₃) ₂	0,577	0,373	0,0077	0,454
NaNO ₂	0,671	0,611	0,0062	0,553
NaCl	0,758	0,684	0,0111	0,692
KCl	0,870	1,104	0,0125	1,021
BaCl ₂	0,940	1,416	0,0460	1,452

*(p<0,05)

Tabela D.4 – Teor de umidade de equilíbrio de adsorção experimental e desvio padrão, e os estimados pelo modelo matemático de GAB, em base seca e seus respectivos valores de a_w para a formulação ótima, a 25 °C.

Solução Salina	a_w	X (b.s.) Adsorção		
		Experimental	Desvio Padrão	Estimados - GAB*
NaOH	0,069	0,214	0,0197	0,194
LiCl	0,112	0,207	0,0100	0,206
MgCl ₂	0,327	0,241	0,0131	0,272
K ₂ CO ₃	0,442	0,297	0,0175	0,318
Mg(NO ₃) ₂	0,536	0,404	0,0575	0,378
NaNO ₂	0,645	0,543	0,0066	0,499
NaCl	0,756	0,683	0,0401	0,664
KCl	0,843	0,888	0,0108	0,953
BaCl ₂	0,904	1,374	0,0038	1,316

*(p<0,05)

Tabela D.5 – Teor de umidade de equilíbrio de adsorção experimental e desvio padrão, e os estimados pelo modelo matemático de GAB, em base seca e seus respectivos valores de a_w para a formulação ótima, a 35 °C.

Solução Salina	a_w	X (b.s.) Adsorção		
		Experimental	Desvio Padrão	Estimados - GAB*
NaOH	0,068	0,218	0,0502	0,204
LiCl	0,111	0,198	0,0025	0,218
MgCl ₂	0,321	0,266	0,0083	0,286
K ₂ CO ₃	0,436	0,330	0,0126	0,341
Mg(NO ₃) ₂	0,516	0,408	0,0040	0,392
NaNO ₂	0,625	0,548	0,0494	0,493
NaCl	0,755	0,684	0,0248	0,711
KCl	0,827	0,928	0,0377	0,940
BaCl ₂	0,897	1,375	0,0674	1,369

*(p<0,05)

Errata

Página 76 Linha 7 Onde se lê Permeabilidade (10^{-10}) Leia-se Permeabilidade ($4,85 \cdot 10^{12}$).

Página 105 Linha 16 Onde se lê Efeito (10^{-10}) Leia-se efeito ($4,85 \cdot 10^{12}$).

Página 106 Linha 11 Onde se lê Coeficiente (10^{-10}) Leia-se permeabilidade ($4,85 \cdot 10^{12}$).

Página 125 Linha 4 Onde se lê 0,070 e 0,907 Leia-se 0,327 e 0,843.

Página 135 Linha 4 Onde se lê PVA Leia-se água.

Página 137 Linha 34 Onde se lê PVDE Leia-se PVDC.

Página 147 Linha 15 Onde se lê colorimetria Leia-se calorimetria.

Página 173 Linha 23 Onde se lê $\text{g.mm/m}^2 \cdot \text{mmHg} \cdot 24$ Leia-se $\text{g.mm/m}^2 \cdot \text{mmHg} \cdot 24\text{h}$ ou $\text{g.mm/m}^2 \cdot \text{mmHg} \cdot \text{dia}$.

Página 193 Linha 14 Onde se lê relativa Leia-se relativamente boa.