



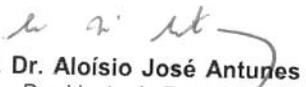
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

APLICAÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE BOVINO NA ELABORAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Cristiana Maria Pedroso Yoshida**, aprovada pela Comissão Julgadora em 13 de novembro de 2002.

Campinas, 13 de novembro de 2002.


Prof. Dr. Aloísio José Antunes
Presidente da Banca

Aluna: Cristiana Maria Pedroso Yoshida
Engenheira Química e
Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Aloísio José Antunes

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade estadual de Campinas, para a obtenção do título de DOUTOR EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

-Campinas, 2002-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Y83a
V	EX
TOMBO BC/	51859
PROC.	16-837-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/12/02
Nº CPD	

CM001770B5-1

BIB ID 27 2477

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

Y83a Yoshida, Cristiana Maria Pedroso
Aplicação de concentrado protéico de soro de leite bovino na
elaboração de filmes comestíveis / Cristiana Maria Pedroso
Yoshida. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Aloísio José Antunes
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Soro de leite. 2.Transglutaminases. 3.Difusão.
4.Emulsões. 5.Embalagem. I.Antunes, Aloísio José.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

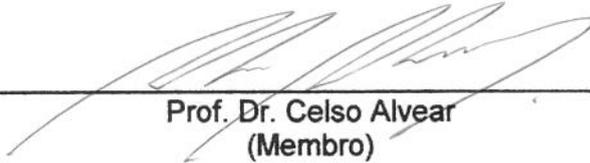
BANCA EXAMINADORA



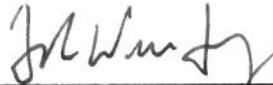
Prof. Dr. Aloísio José Antunes
(Orientador)



Prof. Dr. Carlos Alberto Gasparetto
(Membro)



Prof. Dr. Celso Alvear
(Membro)



Prof. Dr. Tah Wun Song
(Membro)



Profa. Dra. Florencia Cecilia Menegalli
(Membro)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro)

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos
(Membro)

20025864

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente você estará fazendo o impossível"

(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aloísio José Antunes, que muito contribuiu para a minha formação acadêmica através de seu incentivo, respeito, confiança e orientação segura. Obrigada por possibilitar tudo isto!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Antunes, da UFRJ, pela contribuição imprescindível no desenvolvimento de parte deste trabalho, proporcionando e possibilitando todo o aprendizado através de seu conhecimento.

A Banca Examinadora pela leitura atenta e cuidadosa e pela disponibilidade com que conduziram a conclusão deste trabalho .

A Ajinomoto Interamericana Ltda. e Calpro Ingredients pelo fornecimento de matéria-prima.

Agradeço também as pessoas que estiveram comigo durante este período, porque é difícil crescer só com o "trabalho", é necessário também o "dia-a-dia". Então, **MUITO OBRIGADA:**

Ao Flávio, por dividir, acompanhar, pela força, por acreditar, enfim, por me incentivar a fazer sempre o melhor! Obrigada pela sua presença tão **IMPORTANTE** na minha vida!!!

Aos meus pais, Masao e Maria Lúcia, meus irmãos, Helô, Keka, Paulo, e agregados, Bóris, Bruno, Beto, Mizu, Yong, Luciana, Betinha, meus tios Zélia e Zé Carlos, pelo exemplo, pelo incentivo, por acreditar, torcer, vibrar, e por tantas e tantas outras coisas. Obrigada por saber que tenho pessoas tão **ESPECIAIS** ao meu lado!!

A Rose, acho que basta dizer: "Amiga de verdade!!".

A Eliana, Célis, Karla, Adriane, Ana Claudia, da qual o interesse pelo soro de leite permitiu que nos conhecêssemos e assim, pude descobrir pessoas amigas e companheiras: "Obrigada pelo dia-a-dia até hoje e, também pelos que ainda virão!"

Ao Helder, meu amigo-irmão, e à Lia agradeço tudo de maravilhoso que sempre posso encontrar em vocês.

E também: Eliana Kamimura, Sônia, Janaína, André, Cris, Jones, Beto, Eliane, Edson Coxinha, Gustavo, Helenice, Orneyde, Henelyta, Amaro, Eliana (boliviana), Martinha, Mariana, Renata, por todos os momentos divertidos e construtivos que passamos aqui em Campinas.

Ao pessoal da FEA: Chico, Cosme, Cidinha, Geraldo, Creusa, Cláudia, Jonas, por todo o empenho. "Porque o êxito também depende de vocês!"

A FAPESP pelo apoio financeiro.

A Deus, pela oportunidade de encontrar e viver tudo isto, e com a alegria de avaliar que aprendi, e muito...

Kity

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
NOMENCLATURA	xx
RESUMO	xxii
SUMMARY	xxiii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – FILMES COMESTÍVEIS E/OU BIODEGRADÁVEIS	3
2.2 – PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE	5
2.3 – FORMAÇÃO DE FILMES PROTÉICOS	7
2.4 – PROPRIEDADES DE BARREIRA	12
2.4.1 – PERMEABILIDADE	14
2.4.1.1 - Permeabilidade ao vapor d'água	15
2.4.2 – SOLUBILIDADE	17
2.4.3 – ISOTERMAS DE SORÇÃO	17
2.4.3.1 – Calor isostérico de sorção	21
2.5 – PROPRIEDADES MECÂNICAS	23
2.6 – DIFUSÃO EM FILMES	24
2.7 – FILMES EMULSIONADOS	27
2.7.1 - FORMAÇÃO DOS FILMES EMULSIONADOS	29
2.7.2 - PROPRIEDADES DE BARREIRA E MECÂNICAS DOS FILMES EMULSIONADOS	30
2.8 - MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE	32
2.8.1 – TRANSGLUTAMINASE	33
2.8.2 - APLICAÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE	36

2.8.3 - APLICAÇÃO EM FILMES COMESTÍVEIS	37
2.9 – APLICAÇÃO DE FILMES PROTÉICOS	39
2.10 – DIGESTIBILIDADE DE FILMES PROTÉICOS	43
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	45
<hr/>	
3.1 – MATERIAIS	45
3.2 – MÉTODOS	46
3.2.1 – FLUXOGRAMA GERAL DAS ETAPAS DESENVOLVIDAS	46
3.2.2 – CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	47
3.2.3 - FORMAÇÃO DOS FILMES	47
3.2.4 - AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS FILMES	48
3.2.5 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	48
3.2.6 - SOLUBILIDADE PROTÉICA	48
3.2.7 - PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA	49
3.2.8 - TENSÃO NA RUPTURA E PORCENTAGEM DE ELONGAÇÃO	49
3.3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	50
3.4 - ISOTERMAS DE SORÇÃO	52
3.5 - OBTENÇÃO DE FILMES MULTICOMPONENTES	54
3.5.1 - FORMAÇÃO DO FILME EMULSIONADO	54
3.5.2 - CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS	54
3.6 - DIFUSÃO EM FILMES PROTÉICOS A BASE DE SORO DE LEITE	54
3.7 – OBTENÇÃO DE FILMES PROTÉICOS POR MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA UTILIZANDO TRANSGLUTAMINASE	55
3.7.1 - EXCLUSÃO MOLECULAR	56
3.7.2 – ELETROFORESE	56
3.7.3 - CARACTERIZAÇÃO DO FILME	56
3.8 - APLICAÇÃO DOS FILMES PROTÉICOS A BASE DE SORO DE LEITE	57
3.9 - DIGESTIBILIDADE DOS FILMES PROTÉICOS A BASE DE SORO DE LEITE	58
3.10 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
4 - INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA, PLASTIFICANTE E pH	59
<hr/>	
4.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	59
4.1.1 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	60
4.1.2 – SOLUBILIDADE PROTÉICA	63

4.1.2.1 - Efeitos de cada variável independente sobre a resposta solubilidade protéica	64
4.1.2.2 - Determinação do modelo empírico para a resposta solubilidade protéica	65
4.1.2.3 - Estudo das superfícies de resposta	68
4.1.3 - PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA	71
4.1.3.1 - Efeitos de cada variável sobre a resposta permeabilidade ao vapor d'água	71
4.1.3.2 - Determinação do modelo empírico	73
4.1.3.3 - Estudo das superfícies de resposta	74
4.1.4 - TENSÃO NA RUPTURA E ELONGAÇÃO	77
4.1.4.1 - Efeitos sobre a resposta tensão na ruptura	78
4.1.4.2 - Determinação do modelo para tensão na ruptura	79
4.1.4.3 - Estudo das superfícies de resposta para tensão na ruptura	80
4.1.4.4 - Efeitos de cada variável sobre a resposta alongação	83
4.1.4.5 - Determinação do modelo empírico para alongação	84
4.1.4.6 - Estudo das superfícies de resposta alongação	85
4.1.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS	88
4.2 - FILME PADRÃO	90
4.2.1 – CARACTERIZAÇÃO DO FILME PROTÉICO	90
4.2.2 – ISOTERMAS DE SORÇÃO	91
4.2.3 - CALOR ISOSTÉRICO DE SORÇÃO	97
4.2.4 - CONCLUSÕES PARCIAIS	99
<u>5- FILMES MULTICOMPONENTES – FILMES EMULSIONADOS</u>	101
5.1- SOLUBILIDADE PROTÉICA	104
5.2 - PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA	105
5.3 - TENSÃO NA RUPTURA E PORCENTAGEM DE ELONGAÇÃO	108
5.4 - CONCLUSÕES PARCIAIS	112
<u>6 - DIFUSÃO EM FILMES PROTÉICOS A BASE DE SORO DE LEITE</u>	114
6.1 - DIFUSÃO EM FILMES PADRÃO	115
6.1.1 - ADSORÇÃO NA POSIÇÃO VERTICAL	115
6.1.2 - ADSORÇÃO NA POSIÇÃO HORIZONTAL	120

6.2 - DIFUSÃO EM FILMES EMULSIONADOS	129
6.2.1 - ADSORÇÃO NA POSIÇÃO VERTICAL	130
6.2.2 - ADSORÇÃO NA POSIÇÃO HORIZONTAL DE FILMES EMULSIONADOS	132
6.3 – CONCLUSÕES PARCIAIS	137
<u>7 - MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA NOS FILMES DE SORO DE LEITE</u>	<u>139</u>
7.1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA	140
7.1.1 - SOLUBILIDADE PROTÉICA	140
7.1.2 - PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA	143
7.1.3 - TENSÃO NA RUPTURA E ELONGAÇÃO	145
7.2 - EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO	149
7.2.1 - SOLUBILIDADE PROTÉICA	150
7.2.2 - PERMEABILIDADE AO VAPOR D'ÁGUA	151
7.2.3 - TENSÃO NA RUPTURA E ELONGAÇÃO	153
7.3 - SISTEMA MODELO	156
7.4 - ELETROFORESE E EXCLUSÃO MOLECULAR	158
7.4.1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA	158
7.4.2 - EFEITO DE TEMPO DE REAÇÃO	162
7.4.3 - SISTEMA MODELO	166
7.5 - CONCLUSÕES PARCIAIS	169
<u>8 - APLICAÇÃO DE FILMES PROTÉICOS A BASE DE SORO DE LEITE</u>	<u>171</u>
8.1 - FILMES PROTÉICO DE SORO DE LEITE	171
8.2 - SISTEMA DE EMBALAGEM	175
8.2.1 - ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA CONTROLADA	177
8.2.2 - ARMAZENAMENTO A FRIO	187
8.3 – CONCLUSÕES PARCIAIS	197
<u>9 – CONCLUSÕES GERAIS</u>	<u>199</u>
<u>10 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>204</u>

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de ingredientes de soro de leite	6
Tabela 2: Habilidade das proteínas do soro de leite em formar polímeros ou dímeros a partir da reação com transglutaminase.	38
Tabela 3: Matriz de planejamento 2^3 +pontos axiais.....	50
Tabela 4: Tabela de valores codificados e decodificados referentes ao planejamento fatorial 2^3 +pontos axiais.....	51
Tabela 5: Matriz das condições do planejamento fatorial 2^3 +pontos axiais.	52
Tabela 6: Variação da atividade de água de equilíbrio com a temperatura	53
Tabela 7: Solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos obtidos a partir do planejamento experimental, sendo as variáveis independentes: concentração de proteína (%Cp), concentração de plastificante (%Cg) e pH.....	62
Tabela 8: Efeitos principais e de interação das variáveis independentes na resposta solubilidade e seus erros padrão.	64
Tabela 9: Análise da variância para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a resposta solubilidade protéica.....	66
Tabela 10: Coeficientes de regressão estimados para a resposta solubilidade protéica.....	67
Tabela 11: Efeitos principais e de interação das variáveis independentes na resposta permeabilidade ao vapor d'água e seus erros padrão.....	72
Tabela 12: Análise da variância para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a permeabilidade ao vapor d'água.....	73
Tabela 14: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a resposta tensão na ruptura.....	79
Tabela 15: Efeitos principais das variáveis independentes na resposta alongação.	83
Tabela 16: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a resposta porcentagem de alongação.....	85
Tabela 17: Caracterização dos filmes protéicos a base de soro de leite.	91
Tabela 18: Teor de umidade de equilíbrio dos filmes protéicos a base de soro de leite sob diferentes valores de umidade relativa.	92
Tabela 19: Valores dos coeficientes de correlação (R^2), porcentagem de confiança (P) e erro (E) obtidos através do ajuste dos modelos matemáticos das isotermas de adsorção.....	93
Tabela 20: Parâmetros (X_m , C e K) da equação de GAB calculados pelo ajuste das isotermas de adsorção em diferentes condições de temperatura.....	94
Tabela 21: Valores calculados do calor de sorção dos filmes protéicos a base de soro de leite, para diferentes teores de umidade.	98
Tabela 22: Teor de proteína e de umidade em filmes emulsionados em pH 7,0 e 9,0.....	103

Tabela 23: Solubilidade protéica de filmes emulsionados em pH 7,0 e 9,0.	104
Tabela 24: Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.	106
Tabela 25: Tensão na ruptura de filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.....	109
Tabela 26: Porcentagem de alongação de filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.	110
Tabela 27: Massa ganha nos filmes protéicos a base de soro de leite (padrão) acondicionados na posição vertical a 25°C e 75% de umidade relativa.....	118
Tabela 28: Massa ganha dos filmes protéicos de soro de leite em função do tempo de acondicionamento nas posições horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo.	124
Tabela 29: Massa normalizada média dos filmes protéicos a base de soro de leite (filme padrão) em função do tempo de acondicionamento nas posições horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo.....	126
Tabela 30: Massa média de água adsorvida, massa normalizada média e desvio padrão de filmes protéicos emulsionados de soro de leite, acondicionados na posição vertical.	130
Tabela 31: Massa ganha em filmes protéicos emulsionados de soro de leite, acondicionados na posição horizontal com a face do filme voltada para baixo e para cima.....	133
Tabela 32: Massa média adsorvida (cima e baixo), massa normalizada média e desvio padrão dos filmes emulsionados de soro de leite acondicionados na posição horizontal.	134
Tabela 33: Teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica dos filmes a base de soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.	141
Tabela 34: Teor de proteína e solubilidade protéica de filmes sem adição de transglutaminase e na presença de lactose e dextrina.....	142
Tabela 35: Permeabilidade ao vapor d'água em função da concentração de transglutaminase adicionada em filmes protéicos a base de soro de leite.	143
Tabela 36: Tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos a base de soro de leite em função da concentração de transglutaminase adicionada na solução.	146
Tabela 37: Tensão na ruptura e porcentagem de alongação de filmes protéicos a base de soro de leite obtidos sem a adição de transglutaminase e na presença de lactose e dextrina em concentrações equivalentes.	148
Tabela 38: Teor de proteína, e teor de umidade de filmes protéicos a base de soro de leite obtidos com e sem adição de transglutaminase em função do tempo de reação.....	149
Tabela 39: Solubilidade protéica dos filmes a base de proteínas do soro de leite, na presença (10U/g proteína) e ausência da transglutaminase.....	150
Tabela 40: Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos a base de soro de leite, com (10U/ g proteína) e sem adição de transglutaminase em função do tempo de reação.	152

Tabela 41: Propriedades mecânicas dos filmes protéicos a base de soro de leite formulados com e sem a adição de transglutaminase.	154
Tabela 42: Caracterização dos filmes obtidos pelo sistema modelo (α -Ia e β -Ig) com e sem a adição de transglutaminase (TG).....	157
Tabela 43: Características finais dos diferentes tipos de filmes protéicos de soro de leite.	172
Tabela 44: Parâmetros de cor, opacidade com os respectivos desvios padrão dos filmes protéicos de soro de leite, formulados por diferentes processos.	172
Tabela 45: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas em sistemas de embalagem aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite a T=25°C e UR=75%.	179
Tabela 46: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de acondicionamento a 25°C e 75% de umidade relativa.	180
Tabela 47: Perfil de textura das maçãs acondicionadas em sistemas de embalagem abertos e fechados com filmes protéicos de soro de leite a T=25°C e UR=75%.	181
Tabela 48: Índice de luminosidade (valores médio de $L^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com diferentes filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção do gás nitrogênio, na T=25°C e UR=75%.	183
Tabela 49: Índice de croma (valor médio de $a^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite com (N ₂) e sem (ar) a injeção do gás nitrogênio, na T=25°C e UR=75%.	184
Tabela 50: Índice de croma (valor médio de $b^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com diferentes filmes protéicos de soro de leite com (N ₂) e sem (ar) a injeção do gás nitrogênio, na T=25°C e UR=75%.	186
Tabela 51: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas em sistemas de embalagem aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite a 10°C.	188
Tabela 52: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de acondicionamento na temperatura de 10°C.	190
Tabela 53: Perfil de textura das maçãs acondicionadas em sistemas de embalagem abertos e fechados com filmes protéicos de soro de leite a 10°C.	191
Tabela 54: Índice de luminosidade (valor médio de $L^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos com (N ₂) e sem (ar) a injeção de nitrogênio, na T=10°C.	193
Tabela 55: Índice de croma (valor médio de $a^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos com (N ₂) e sem (ar) a injeção do gás nitrogênio, na T=10°C.	194
Tabela 56: Índice de croma (valor médio de $b^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes de soro de leite com (N ₂) e sem a injeção de nitrogênio, na T=10°C.	196

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na resposta solubilidade protéica dos filmes de soro de leite.....	64
Figura 2: Valores observados em função dos valores preditos pelo modelo para a solubilidade protéica de filmes protéicos a base de proteínas do soro de leite.....	67
Figura 3: Superfícies de resposta e curvas de nível para a solubilidade protéica.....	69
Figura 4: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na resposta permeabilidade ao vapor d'água.....	72
Figura 5: Superfícies de resposta e curvas de nível para a permeabilidade ao vapor d'água.....	75
Figura 6: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na tensão na ruptura.....	78
Figura 7: Superfícies de resposta e curvas de nível para a tensão na ruptura.....	81
Figura 8: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na resposta porcentagem de alongação.....	84
Figura 9: Superfícies de resposta e curvas de nível para a porcentagem de alongação.....	87
Figura 10: Isotermas de adsorção de filmes protéicos a base de soro de leite, ajustadas pelas equações de GAB, BET e Halsey na temperatura de 25°C.....	93
Figura 11: Isotermas de adsorção de filmes protéicos a base de soro de leite, em diferentes temperaturas, ajustadas pela equação de GAB.....	95
Figura 12: Relação entre a atividade de água e temperatura absoluta, baseada na equação de Clausius-Clapeyron, para filmes protéicos a base de soro de leite.....	98
Figura 13: Influência do teor de umidade no calor de sorção dos filmes protéicos a base de soro de leite.....	99
Figura 14: Solubilidade protéica de filmes emulsionados de proteínas do soro de leite.....	105
Figura 15: Permeabilidade ao vapor d'água de filmes emulsionados a base de proteína do soro de leite com ácido esteárico.....	107
Figura 16: Tensão na ruptura de filmes emulsionados compostos por proteína do soro de leite e ácido esteárico em pH 7,0 e 9,0.....	109
Figura 17: Porcentagem de alongação de filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.....	111
Figura 18: Massa normalizada de vapor d'água adsorvida pelos filmes protéicos de soro de leite acondicionados a 25°C e 75% de umidade relativa, na posição vertical, em função do tempo.....	119
Figura 19: Massa normalizada de vapor d'água adsorvido pelos filmes a base de proteínas do soro de leite acondicionados a 75% de umidade relativa e 25°C na posição horizontal.....	127
Figura 20: Massa normalizada média em função do tempo de acondicionamento dos filmes protéicos emulsionados a base de soro de leite, acondicionados na posição vertical.....	131
Figura 21: Massa normalizada média em função do tempo de acondicionamento dos filmes protéicos emulsionados à base de soro de leite, acondicionados na posição horizontal.....	135

Figura 22: Efeito da concentração de transglutaminase na solubilidade protéica dos filmes a base de proteína do soro de leite.....	141
Figura 23: Permeabilidade ao vapor d'água de filmes protéicos a base de soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.....	144
Figura 24: Tensão na ruptura dos filmes a base de proteína do soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.....	146
Figura 25: Porcentagem de alongação dos filmes a base de proteína do soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.....	148
Figura 26: Solubilidade protéica dos filmes a base de soro de leite, com e sem adição de transglutaminase, em função do tempo de reação.....	151
Figura 27: Permeabilidade ao vapor d'água de filmes protéicos a base de soro de leite com e sem adição de transglutaminase em função do tempo de reação.....	152
Figura 28: Tensão na ruptura dos filmes protéicos a base de soro de leite, com e sem adição de transglutaminase, em função do tempo de reação.....	155
Figura 29: Alongação dos filmes protéicos a base de soro de leite, com e sem adição de transglutaminase, em função do tempo de reação.....	155
Figura 30: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da polimerização das proteínas do soro de leite catalisadas pela transglutaminase sob diferentes concentrações de enzima (U/g proteína) na obtenção de filmes protéicos: (1) padrão; (2) CPS; (3) 0UTG; (4) 10UTG; (5) 20UTG; (6) 30UTG; (7) 40UTG, (8) 50UTG.....	158
Figura 31: Perfil cromatográfico do concentrado protéico do soro de leite.....	160
Figura 32: Perfis cromatográficos do efeito da concentração de transglutaminase na reação cruzada das proteínas do soro de leite na obtenção de filmes protéicos: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.....	160
Figura 33: Perfis cromatográficos do efeito da concentração de transglutaminase na reação cruzada das proteínas do soro de leite na obtenção de filmes protéicos, com a adição de 0 e 30U/g proteína: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.....	161
Figura 34: SDS-PAGE da reação da transglutaminase com as proteínas do soro de leite na obtenção de filmes protéicos em função do tempo de reação: (1) padrão; (2) enzima TG; (3) CPS; (4) 0 min; (5) 60 min; (6) 120 min; (7) 180 min; (8) 240 min.....	163
Figura 35: Perfil cromatográfico do efeito do tempo de reação na formação de filmes protéicos a base de soro de leite através da catálise com transglutaminase: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.....	163
Figura 36: Perfil eletroforético da reação para a obtenção de filmes protéicos a base de soro de leite sem a adição da enzima transglutaminase: (1) padrão; (2) CPS; (3) 0 min; (4) 60 min; (5) 120 min; (6) 180 min; (7) 240 min.....	164

Figura 37: Perfil cromatográfico do efeito do tempo de reação na formação de filmes protéicos a base de soro de leite na ausência da enzima transglutaminase: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.	165
Figura 39: Perfil eletroforético do sistema modelo (α -la e β -lg) na obtenção de filmes através da catálise com TG: (1) padrão; (2) enzima TG; (3) α -la; (4) β -lg; (5) 0U; (6) 10U.....	167
Figura 40: Perfil cromatográfico da reação de transglutaminase com as principais proteínas do soro de leite (α -la e β -lg) em sistema modelo: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.....	167
Figura 41: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da amostra contendo o polímero de alto peso molecular sob diferentes concentrações: (1) e (2) 6,6mg proteína; (3) e (4) 1,9mg proteína; (5) e (6) 4,7mg proteína.....	169
Figura 42: Filmes protéicos de soro de leite obtidos por diferentes procedimentos: a) filme padrão, b) filme emulsionado e c) filme TG.	174
Figura 43: Sistema de embalagem fechado com filmes protéicos de soro de leite contendo cilindros de maçã.	176
Figura 44: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas a 25°C e 75% de umidade relativa em sistema aberto e fechado com diferentes tipos de filmes protéicos de soro de leite.	178
Figura 45: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de armazenamento em condições de temperatura e umidade relativa controladas (25°C e 75%).	180
Figura 46: Perfil de textura das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite em função do tempo de armazenamento.	182
Figura 47: Índice de luminosidade das amostras de maçã armazenadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite.	183
Figura 48: Índice de croma a* das amostras de maçã acondicionadas a 25°C e 75% de umidade relativa em sistemas aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio.....	185
Figura 49: Índice de croma b* das amostras de maçã acondicionadas a 25°C e 75% de umidade relativa em sistemas aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio.....	187
Figura 50: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas a 10°C em sistema aberto e fechado com diferentes tipos de filmes protéicos de soro de leite.....	189
Figura 51: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de armazenamento em condições de temperatura de 10°C.....	190
Figura 52: Perfil de textura das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite obtidos por diferentes processos em função do tempo de armazenamento a 10°C.	192

Figura 53: Índice de luminosidade das amostras de maçã armazenadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite a 10°C.....	193
Figura 54: Índice de croma a* das amostras de maçã acondicionadas a 10°C em sistemas aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio.....	195
Figura 55: Índice de croma b* das amostras de maçã acondicionadas a 10°C de em sistemas aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite.....	197

NOMENCLATURA

a^* , a_o^* , b^* , b_o^*	índice de croma	
a_w	atividade de água	
A	área superficial do filme	(m^2)
C	concentração mássica de umidade	(kg/m^3)
C_G	constante de Guggenheim	
C_E	concentração de transglutaminase	(U/g proteína)
C_g	concentração de glicerol	(%)
C_o	concentração mássica de umidade inicial	(kg/m^3)
C_p	concentração de proteína	(%)
CPS	concentrado protéico de soro de leite	
C'	constante relacionada ao calor de sorção	
C_s	concentração de umidade na superfície	(kg/m^3)
D_V , D_H , D_{emV} , D_{emH}	coeficiente de difusão	(m^2/s)
E	módulo de desvio relativo médio	(%)
F	força de perfuração	(N)
g	aceleração da gravidade	(m^2/s)
FP	filme padrão	
FEM	filme emulsionado	
FTG	filme catalisado com transglutaminase	
H_m	calor total de sorção da 1ª camada	(kJ/kg)
H_n	calor total de sorção das multicamadas	(kJ/kg)
H_l	calor de condensação da água pura	(kJ/kg)
IPS	isolado protéico de soro de leite	
J	fluxo difusivo de umidade	($kg/s.m^2$)
L	espessura dos filmes	(mm)
L^* , L_o^*	índice de luminosidade	
m	diferença de massa após equilíbrio	(g)
m_V , m_{emV}	diferença de ganho de massa de umidade nos filmes acondicionados na posição vertical	(g)
m_H , m_{emH}	diferença de ganho de massa de umidade nos filmes acondicionados na posição horizontal	(g)
M	massa de umidade adsorvida pelo filme	(g)
M_t	quantidade total de umidade difundida no tempo t	(g)
M_∞	quantidade total de umidade difundida no tempo infinito	(g)
M_o	massa inicial do filme	(g)
M_p	diferença de massa de penetrante que atravessou o filme	(g)
M_s	massa do filme no estado estacionário	(g)
P	porcentagem de confiança	(%)
P_H	parâmetro da equação de Halsey	
p	pressão parcial do vapor d'água em equilíbrio	(kPa)
p_o	pressão parcial do vapor d'água pura	(kPa)
n	número de variáveis independentes	
Q	quantidade de permeante	(kg)
Q_{st}	calor isostérico de sorção	(kJ/kg)
q_{st}	excesso de calor isostérico de sorção	(kJ/kg)
r	parâmetro da equação de Halsey	
R	constante universal dos gases	(kJ/kg)

R^2	índice de correlação	
S	área superficial	(m ²)
S_h	parâmetro da equação de Halsey	
SP	solubilidade protéica	(%)
SQ	soma quadrática	
MQ	média quadrática	
t	tempo	(s, min, h)
T	temperatura	(°C, K)
TG	transglutaminase	
UR	umidade relativa	(%)
x	direção do fluxo de umidade	
X	teor de umidade (base úmida)	(%)
X_{bs}	teor de umidade (base seca)	(kg/kg)
X_m	teor de umidade na monocamada	(kg/kg)
σ	desvio padrão	
μ	massa normalizada de umidade adsorvida	
μ_v, μ_{emv}	massa normalizada de umidade adsorvida na posição vertical	
μ_H, μ_{emH}	massa normalizada de umidade adsorvida na posição horizontal	
β	parâmetro que relaciona α e D	
α	parâmetro referente ao fluxo de umidade devido a força da gravidade	
α_p	constante do cálculo dos pontos axiais	
θ	parâmetro equação de Halsey	
ΔE	diferença de cor dos filmes em relação ao filme padrão	
Δp	diferença de pressão parcial	(kPa)
ΔH_{BET}	entalpia de absorção da monocamada	(kJ/kg)
ΔH_{vap}	calor de vaporização da água pura	(kJ/kg)
A, B, c, K, K_n , k, k', A_n	constantes	

RESUMO

A formação de filmes protéicos de soro de leite vem sendo estudada para a aplicação como embalagem alternativa, devido às vantagens que proporciona, como, propriedades de barreira à transferência de massa, características nutricionais favoráveis, caráter biodegradável e a agregação de valor à um descarte industrial. O objetivo deste estudo foi determinar a melhor formulação para a obtenção de filmes protéicos de soro de leite, quanto à concentração de proteína, plastificante e pH, avaliando através das principais propriedades de barreira e mecânicas; a incorporação de lipídio na solução filmogênica, visando reduzir a permeabilidade ao vapor d'água; o cálculo do coeficiente de difusão do vapor d'água através dos filmes; a obtenção de filmes por modificação enzimática utilizando a enzima transglutaminase; e a aplicação dos filmes protéicos de soro de leite, verificando as características finais encontradas. Inicialmente, a formulação padrão foi determinada através do estudo dos efeitos provocados pela concentração de proteína, concentração de plastificante e pH na obtenção dos filmes por desnaturação térmica, utilizando um planejamento fatorial completo (2^3 +pontos axiais), sendo avaliados pelas características finais: solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e alongação, definindo uma melhor formulação (filme padrão) composta por 6,5% proteína, 3,0% plastificante (glicerol) e pH 7,0. A partir desta, um composto hidrofóbico (ácido esteárico) foi incorporado em diferentes concentrações e pH, visando reduzir a permeabilidade ao vapor d'água, que é alta em filmes protéicos devido à natureza hidrofílica das proteínas. A adição foi feita através de homogeneização formando um filme emulsionado, em concentrações ideais para manter boas propriedades mecânicas. Não foi possível obter filmes emulsionados em pH ácido, e a melhor formação foi em pH 9,0 com a adição de 0,50% de ácido esteárico, com o menor valor de permeabilidade ao vapor d'água e boas propriedades mecânicas, mas optou-se por trabalhar em pH 7,0, que também apresentou menor permeabilidade ao vapor d'água. A transferência de vapor d'água através de filmes padrão e emulsionado foi comparada a partir do cálculo do coeficiente de difusão obtido dos dados de adsorção de umidade (25°C e 75% de umidade relativa) e a Lei de Fick, em diferentes posições, observando que na posição vertical foi possível diferenciar a característica hidrofílica com a adição de um composto hidrofóbico, ao contrário da posição horizontal que evidenciou a formação de uma emulsão instável. A estrutura da matriz filmogênica está diretamente relacionada com as características finais dos filmes, assim, outra metodologia foi aplicada para a obtenção de filmes protéicos de soro de leite com melhores propriedades mecânicas e barreira, a modificação enzimática utilizando a enzima transglutaminase microbiana. A concentração de enzima e o tempo de reação foram testados, observando a formação de uma matriz filmogênica mais estável ou com maior número de ligações isopeptídicas entre as cadeias protéicas, reduzindo a permeabilidade ao vapor d'água, aumentando a tensão na ruptura e a porcentagem de alongação, na concentração de 10U/g proteína e 180 minutos de reação, trabalhando nas condições ótimas da enzima (50°C e pH 7,0). A formação de um polímero de maior peso molecular, correspondendo a matriz filmogênica, foi constatada através dos perfis eletroforético e cromatográfico. Os filmes padrão, emulsionado e modificado enzimaticamente foram aplicados em um sistema de embalagem contendo pedaços de maçã, verificando as características finais de propriedade de barreira ao vapor d'água e mecânicas através da perda de peso, teor de umidade e textura final das maçãs, além da propriedade de barreira a gases através da mudança de cor da maçã em função do tempo de armazenamento. A partir destes resultados, concluiu-se que filmes protéicos de soro de leite apresentam características para serem aplicados como embalagem alternativa prolongando o armazenamento e mantendo a integridade de um alimento, proporcionando uma moderada barreira à umidade e gases.

SUMMARY

Whey protein films offer potential to extend the shelf life and improve quality of food systems by acting as a mass transfer barriers. Other advantages are the biodegradability characteristic, nutritional value aggregated and the industrial discard applying. The aim of this work was evaluated the protein, plasticizer concentration and pH values of the solution to film formation applying heat denaturation; obtained emulsion film adding stearic acid; determined the water vapor diffusion coefficient through protein films; produced whey protein films by enzymatic modification using microbial transglutaminase; and the film application as a food packaging. Protein concentration, plasticizer concentration and pH values were optimized to obtain flexible whey protein films, using an experimental design (response surface methodology). The effect of these variables was investigated at a film formation conditions analyzing the final properties of the films as protein solubility, water vapor permeability, tensile strength and elongation. The optimum conditions was reached at 6,5% protein, 3,0% plasticizer (glycerol) and pH 7,0. The predominantly hydrophilic nature of proteins results in a poor moisture barrier, then a hydrophobic component (stearic acid) was incorporated in a film solution at different ratios and pH (5,0, 6,0, 7,0 e 9,0) forming a emulsion film with reduced water vapor permeability. Intact films could not be obtained at acidic pH and the minimum water vapor permeability was observed at pH 9,0, adding 0,5% of stearic acid. The water vapor diffusion coefficient was determined through whey protein films with and without stearic acid. An experimental procedure was developed for measuring the gain moisture (weight) in function of time data at 75% relative humidity and 25°C. A diffusion mechanism followed linear Fick's law. The effect of the film position (vertical, horizontal with the external face upward and downward) was compared. The addition of stearic acid (1,0%) led to a reduction diffusivity in a vertical plane, but in a horizontal plane, an unstable emulsion was observed. Mechanical and barrier properties are influenced by the network structure of the films, then an enzymatic crosslinking was applied to form whey protein films using microbial transglutaminase to improve the barrier and mechanical properties. Changes in water vapor permeability, protein solubility, tensile strength and elongation were evaluated in function of the enzyme concentration and incubation time at 50°C and pH 7,0 (optimum conditions of transglutaminase). Intermolecular isopeptide crosslinking produced a polymeric network reducing the water vapor permeability and increasing the tensile strength and elongation at 10U/g protein of transglutaminase and 180 minutes of incubation time. SDS-PAGE and size-exclusion-HPLC showed a high molecular weight polymer formation corresponding a film matrix. Films obtained by heat denaturation, emulsion method and enzymatic modification were applied in a food system (cylinders of apples) to verify the final characteristics of films in function of storage time, evaluating the moisture barrier comparing the weight loss, moisture and texture profile, and the gas permeability measured by the apple color change. Whey protein films could be applied as a alternative packaging to extend the shelf life of foods, acting as a moderate moisture and gas barrier, with good mechanical properties (strong and flexible protein films).

CAPÍTULO 1

1 - Introdução

O desenvolvimento e as aplicações de materiais como embalagens comestíveis e biodegradáveis têm merecido atenção intensa dos pesquisadores durante as últimas décadas. Isto é uma consequência da demanda dos consumidores por alimentos de maior qualidade e com vida de prateleira prolongada. Esta demanda por materiais que assegurem qualidade e conveniência aos produtos alimentícios tem sido o fator motivador para o estudo de filmes e coberturas comestíveis. Constituem-se em versáteis materiais de embalagem uma vez que podem ser empregados em sistemas de alimentos heterogêneos, em embalagens pequenas ou individuais, em microencapsulação de acidulantes, aromatizantes, corantes, enzimas, minerais e vitaminas. Além destas propriedades, filmes comestíveis são biodegradáveis, contribuindo, assim, para a redução de poluição ambiental. Entretanto, algo importante deve ser considerado: filmes e coberturas comestíveis não podem ser empregados como substitutos de materiais de embalagem sintéticos para produtos alimentícios com vida de prateleira prolongada.

Entre os diversos materiais pesquisados para a produção de filmes comestíveis, o soro de leite bovino merece atenção. O soro de leite, um subproduto da indústria do queijo e caseína, possui alto valor funcional e nutritivo e, devidamente processado, seja como concentrado ou isolado protéico, constitui-se num excelente ingrediente para a fabricação de vários alimentos industrializados. Uma quantidade substancial de soro de leite é descartada anualmente no Brasil, na forma de resíduo industrial, causando um

grave problema ambiental, sendo necessário tratá-lo convenientemente para reduzir os danos. Além disso, a produção de filmes de proteínas de soro de leite pode representar uma aplicação significativa para agregar valor a um resíduo descartável, sem valor comercial, com a vantagem de formar filmes transparentes, flexíveis, sem odor e sabor.

A aplicação dos filmes como embalagens em alimentos exige propriedades de barreira à umidade, gases e propriedades mecânicas que garantam a integridade do produto durante o manuseio, embalagem, transporte e consumo. As características finais estão diretamente relacionadas à formulação aplicada e às ligações entre as cadeias de proteínas que formam a matriz filmogênica. Filmes protéicos de soro de leite tendem a apresentar alta permeabilidade ao vapor d'água devido à natureza hidrofílica das proteínas e plastificante, favorecendo a ligação com moléculas de água, evidenciando a importância do controle de suas concentrações na obtenção de filmes. A adição de um composto hidrofóbico, ou seja, um lipídio, reduz a difusividade do vapor d'água promovendo melhores propriedades de barreira à umidade, mas em concentrações limite para não perder propriedades mecânicas necessárias para o manuseio. Outra técnica que vem sendo utilizada para melhorar as características dos filmes é o aumento da reação cruzada entre as cadeias poliméricas por modificação enzimática ou química.

A caracterização dos filmes em relação à propriedade de barreira à umidade é uma maneira de conhecer como a matriz filmogênica interage com a água. Este estudo pode ser realizado através da determinação da permeabilidade ao vapor d'água, da construção de isotermas de sorção dos filmes protéicos e pela determinação do coeficiente de difusão do vapor d'água nos filmes.

O objetivo deste estudo foi determinar a melhor formulação para a obtenção de filmes protéicos à base de soro de leite, quanto à concentração de proteína, plastificante e pH, avaliando-os quanto às principais propriedades de barreira e mecânicas; a adição de lipídio visando reduzir a permeabilidade ao vapor d'água; o cálculo do coeficiente de difusão do vapor d'água através dos filmes; a obtenção de filmes por modificação enzimática utilizando a enzima transglutaminase microbiana; e a aplicação dos diferentes tipos de filmes protéicos em produtos alimentícios, verificando o efeito quanto à integridade dos mesmos.

CAPÍTULO 2

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 – Filmes Comestíveis e/ou Biodegradáveis

Filmes comestíveis são definidos como camadas finas de material, digeríveis, aplicados em alimentos ou entre componentes do alimento, com o objetivo de inibir a migração de umidade, gases, aromas, lipídios e outros, podendo atuar também como veículos de ingredientes do alimento, entre os quais agentes antimicrobianos, antioxidantes, vitaminas, corantes e outros. Conforme as condições e situações de aplicação, os filmes comestíveis podem reduzir o uso de embalagens de filmes sintéticos. Filmes biodegradáveis são combinações de polímeros naturais, que podem ser degradados completamente por microrganismos. A biodegradação inclui duas etapas, a despolimerização, ou seja, a divisão da cadeia e a mineralização para gás carbônico, água, sais e outros (Krochta & De Mulder-Jonhston, 1997).

O uso de filmes comestíveis melhora a qualidade de alimentos, atuando como barreira a gases, umidade, aroma e lipídios, além de oferecer proteção ao produto após a abertura da primeira embalagem. O interesse em produtos recicláveis vem crescendo devido à conscientização ambiental (Kim & Ustunol, 2001a). Segundo LeTien et al. (2000), o baixo custo da matéria-prima e a biodegradabilidade são características vantajosas que promovem o interesse no estudo de desenvolvimento de filmes comestíveis.

Os materiais utilizados para formar filmes devem ter aroma e textura aceitáveis, além de possuir flexibilidade, visando evitar a fragmentação durante o manuseio e armazenamento. Assim, a utilização de aditivos (plastificantes, aromas, vitaminas, e outros) torna-se necessária, com a finalidade de proporcionar melhores propriedades mecânicas, organolépticas e de proteção (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997). Os constituintes básicos para a formação dos filmes comestíveis e/ou biodegradáveis foram definidos por Donhowe & Fennema (1994) como polímeros de alto peso molecular (agente formador), solvente, agente plastificante, agente ajustador de pH. Deve-se ressaltar que, o tipo de formulação é definido em relação à natureza e às propriedades desejáveis para o filme (Mahmoud & Savello, 1992).

Os polímeros de alto peso molecular representam o constituinte capaz de formar uma matriz contínua e de alta coesão. Os principais grupos de materiais utilizados são (Guilbert, 1986):

- Proteínas: caseína, proteínas do soro de leite, gelatina, proteína de soja, proteína do milho (zeína), proteína do trigo (glúten) e colágeno;
- Polissacarídeos e seus derivados: derivados de celulose, quitosana, amido, alginatos, pectina e gomas;
- Lipídios: monoglicerídeos, ácidos graxos, ceras naturais e surfactantes;
- Mistura de diferentes materiais visando características específicas dos filmes.

Formulações à base de polissacarídeos produzem filmes com mínima propriedade de barreira à umidade e isto ocorre, devido ao fato de estes polímeros possuírem uma natureza hidrofílica (Kester & Fennema, 1986). Segundo Banker (1966), filmes de certos polissacarídeos podem fornecer uma proteção efetiva contra a oxidação de lipídios e outros componentes de alimentos.

Filmes protéicos podem ser considerados como um tipo de embalagem comestível e/ou biodegradável, que oferecem vantagens sobre as embalagens sintéticas, no que diz respeito à redução de resíduos e poluição ambiental, devido ao seu caráter biodegradável, ou seja a degradação completa em componentes como gás carbônico, água, sais, metano e biomassa, que são produtos da ação de microrganismos. Outra vantagem é a fonte de matéria-prima para a formação do filme, pois são mais fáceis de se

obter, ao contrário da embalagem plástica que é formada a partir de um recurso, que pode ser definido como limitado e não renovável, o petróleo. Segundo Debeaufort et al. (1998), este tipo de embalagem requer características específicas para seu uso, tais como, propriedades de barreira e mecânicas efetivas; estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica; ser inócuo, livre de produtos tóxicos e não poluente; e o processamento ser simples e de baixo custo.

A natureza hidrofílica dos filmes protéicos limita a sua aplicação em produtos que requerem barreira à umidade, assim, diversos estudos vêm sendo realizados para melhorar esta propriedade, tais como, a adição de ceras e ácidos graxos na formulação filmogênica, formando filmes emulsionados; a obtenção de filmes por modificação enzimática através da transglutaminase, que promove reações cruzadas entre as cadeias protéicas (Vachon et al., 2000). Esta enzima promove ligações inter e intramoleculares entre as cadeias de proteínas, formando uma matriz mais forte e compacta, diminuindo sua solubilidade protéica e permeabilidade ao vapor d'água e aumentando a resistência à quebra (Mahmoud & Savello, 1992).

2.2 - Proteínas do Soro de Leite

O soro de leite é um subproduto da indústria do queijo e caseína, e possui um alto valor funcional e nutricional. As proteínas do soro de leite têm sido utilizadas em diversas aplicações alimentícias, devido às suas propriedades funcionais, tais como, a gelatinização, emulsificação, solubilidade, formação de espuma, viscosidade, além do valor nutricional, sendo uma excelente fonte de aminoácidos essenciais (Morr & Ha, 1993). Os ingredientes de soro de leite são encontrados sob diferentes formas, sendo que após o processamento do queijo ou caseína, o soro de leite contém 93% de água e apenas 0,6% de proteína. Então, é concentrado por ultrafiltração e diafiltração, e classificado de acordo com a sua composição, geralmente relacionada ao teor de proteína, como pode ser visto na Tabela 1 (Huffman, 1996).

Tabela 1: Classificação de ingredientes de soro de leite.

Tipo	Teor de proteína (%)	Teor de lactose (%)	Cinzas (%)	Teor de gordura (%)
Soro em pó	13	76	10	1
CPS 35	34-35	53	8	4
CPS 50	53	35	7	5
CPS 80	80	7	4-7	4-7
IPS	90	1	3	1

Fonte: Huffman (1996).

O concentrado protéico de soro de leite CPS 80 e o isolado protéico de soro de leite (IPS) apresentam maior potencial de aplicação quanto às propriedades funcionais, e são obtidos por concentração através da ultrafiltração utilizando uma membrana com porosidade que permite a separação da lactose, sais e minerais (permeado) das proteínas e gorduras (retentado), seguida de secagem por atomização, concentrando até 35-50% de proteína. Para a obtenção de um concentrado com maior teor de proteína o processo de diafiltração é aplicado, que consiste na adição de água no retentado, seguida por uma nova ultrafiltração, após o qual o produto é seco por atomização atingindo 80% de proteína e reduzindo o teor de lactose do produto. Para a obtenção do isolado protéico de soro de leite (IPS), aplica-se mais um processo, purificação por troca iônica aumentando o teor de proteína e reduzindo o teor de lactose e sais minerais (Morr & Ha, 1993; Huffman, 1996; Bryant & McClements, 1998).

Proteínas do soro de leite caracterizam-se por um excelente valor nutricional e possuem propriedades funcionais importantes para a formação de filmes comestíveis, tais como, a solubilidade em água, a gelatinização e a capacidade para atuarem como emulsificantes. Representam 20% das proteínas totais do leite, são globulares, solubilizam em ampla faixa de pH (Morr & Ha, 1993), e caracterizam-se por cinco tipos de proteínas: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, BSA (albumina de soro bovino), imunoglobulinas, peptídeos derivados da caseína. Filmes a base de soro de leite caracterizam-se por não apresentarem aroma e sabor, pela flexibilidade e, dependendo da formulação, variam de transparente a translúcidos. Isto favorece a aplicação em tecnologia de alimentos (Sabato et al., 2001).

A β -lactoglobulina corresponde a maior fração de proteína no soro de leite, sendo representado por 50% das proteínas totais, possui em sua estrutura duas ligações dissulfídicas e um grupo tiol livre por monômero; em temperatura acima de 70°C, ocorre a desnaturação irreversível desta proteína, seguida da polimerização pela formação de pontes dissulfídicas inter e intramoleculares. A α -lactalbumina representa 20% das proteínas totais, possui 4 ligações dissulfídicas, e é a mais resistente a tratamentos térmicos, possui 4 ligações dissulfídicas. A albumina de soro bovino possui a cadeia mais longa das proteínas de soro de leite, contendo 17 ligações dissulfídicas e um grupo livre tiol. Ligam-se a ácidos graxos, outros lipídios e aromas, estabilizando a molécula na desnaturação térmica. As imunoglobulinas e peptídeos derivados da caseína representam as menores frações de proteínas, sendo que as imunoglobulinas são termicamente instáveis e os peptídeos derivados da caseína são anfífilicas e podem afetar a funcionalidade da proteína (Kinsella, 1984; Kinsella & Whitehead, 1989; Morr & Ha, 1993).

2.3 - Formação de Filmes Protéicos

O processo de obtenção dos filmes inicia-se com a gelatinização, ocorrendo uma associação intermolecular ou reação cruzada entre as cadeias poliméricas formando uma matriz tridimensional semi-rígida que envolve e imobiliza o solvente (Kester & Fennema, 1986). Kinsella (1984) associa a formação de filmes à base de proteínas, à interação entre as moléculas por via eletrostática, hidrofóbica, interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio, e ligações dissulfídicas, considerando ainda a influência direta das mesmas nas propriedades, sendo que estas variam com o tipo de proteína e com as condições ambientais. As etapas de formação são influenciadas pelas características da proteína: composição, conformação, flexibilidade molecular e fatores externos, tais como, pH, temperatura, concentração de proteína, tipo de espécie iônica e outros (Kinsella et al., 1982).

Tratamentos físicos, químicos e enzimáticos têm sido aplicados para promover a interação macromolecular entre polímeros, tais como, o tratamento térmico de proteínas, permitindo a formação de ligações dissulfídicas pela troca tiol dissulfídica, por reação

cruzada iônica e ajuste de pH, formando ligações não covalentes, e a modificação enzimática catalisada com transglutaminase e peroxidase (McHugh, 1996).

A formação dos filmes protéicos (matriz macromolecular) consiste na ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia que estabilizam os polímeros no seu estado nativo, seguido de um arranjo e orientação das cadeias poliméricas, formando uma matriz tridimensional estabilizada por novas interações e ligações (Cuq et al., 1998). Ou seja, consiste em uma polimerização endotérmica através da desnaturação da proteína simultaneamente com a desidratação da superfície (Wu & Bates, 1973). A coesão e a adesão estão relacionadas com a estrutura e a química do polímero. As etapas de desnaturação e aplicação de reação cruzada promovem uma ordem molecular aumentando a coesão e a rigidez dos filmes (Banerjee & Chen, 1995).

As condições para a formação de filmes protéicos envolvem o controle de temperatura de desnaturação das proteínas e a utilização de um suporte plano para a evaporação do solvente (Okamoto & Taishido, 1978). As condições de evaporação do solvente (temperatura de secagem e taxa de secagem do solvente), o tipo e quantidade de plastificante adicionado também são fatores importantes (Guilbert, 1986). Anker et al. (1998) ressaltaram que a microestrutura e propriedades físicas dos filmes protéicos são sensíveis a estas condições.

Segundo Roy et al. (1999), o mecanismo de formação dos filmes comestíveis a base de proteínas do glúten corresponde à desnaturação da proteína através do aquecimento das soluções protéicas, reduzindo as ligações dissulfídicas (S-S) existentes e expondo grupos SH. E durante a secagem, as ligações dissulfídicas são formadas novamente, através da oxidação pelo ar, interligando as cadeias de proteína, ou seja o aparecimento da matriz filmogênica. A mesma observação foi feita por McHugh et al. (1994) para isolado protéico de soro de leite e por Gennadios & Weller (1991) para proteína de soja.

Algumas proteínas animais e vegetais apresentam propriedades que favorecem a formação de embalagens biodegradáveis, ou seja, a capacidade de formar redes protéicas e interagir com plastificantes (Ayhllon-Meixueiro et al., 2000). Vários estudos

foram realizados com a formação de filmes à base de diferentes proteínas, tais como, proteínas do soro de leite (McHugh & Krochta, 1994a,b,c,e; Banerjee & Chen, 1995; Mahmoud & Savello 1993; Maté et al., 1996; Pérez-Gago et al., 1999; Sothornvit & Krochta, 2000); caseínas (Mauer et al., 2000; Avenna-Bustillos & Krochta, 1993); proteínas de glúten (Roy et al., 1999; Gontard & Guilbert, 1996; Gennadios et al., 1993a); proteínas de soja (Sabato et al., 2001; Rhim et al., 1999; Gennadios & Weller, 1991); proteínas de milho (zeína) (Herald et al., 1996; Gennadios & Weller, 1990); gelatina (Arvanitoyannis et al., 1997); e proteínas miofibrilares (Cuq et al., 1998).

As características dos filmes protéicos estão diretamente relacionadas com a natureza da interação proteína-proteína, sendo que fatores como a composição de aminoácidos, a distribuição e polaridade, ligações de hidrogênio, ligações dissulfídicas inter e intramoleculares, interferem na formação da matriz filmogênica (Gennadios & Weller, 1991). Segundo Pérez-Gago & Krochta (2001), é importante entender a estrutura e as interações entre as moléculas de proteínas para a obtenção de filmes com características de solubilidade e propriedades mecânicas específicas.

As proteínas do soro de leite apresentam a forma globular e contêm grupos hidrofóbicos e SH no interior de suas moléculas, o que favorece a formação de uma rede compacta e forte. Filmes à base de proteínas do soro de leite apresentam propriedade de barreira a gases devido ao fato de suas proteínas se apresentarem sob a forma altamente polar (Chen, 1995).

O número de ligações dissulfídicas é considerado por Maté & Krochta (1996), como uma parte responsável pela estrutura filmogênica. Para as proteínas do soro de leite bovino, este número varia consideravelmente (α -Lactalbumina, 4; β -Lactoglobulina, 2; BSA, 17; peptídeos derivados da caseína, nenhuma). A estrutura, a partir de proteínas desnaturadas de isolado protéico de soro de leite, é diferente da obtida por frações protéicas desnaturadas do concentrado protéico de soro de leite (por exemplo, β -Lactoglobulina). Estas diferenças estruturais promovem propriedades de permeabilidade dos filmes diferentes entre si.

O tipo e o pH do solvente, a força iônica são parâmetros frequentemente manipulados para alterar as propriedades mecânicas e a porosidade da membrana. Segundo Chen et al. (1994), a mudança no pH e na força iônica altera a repulsão eletrostática inter e intramolecular entre cadeias de proteínas, permitindo a aproximação das mesmas, promovendo ligações de hidrogênio inter e intramolecular. O aumento da permeabilidade foi observado por McHugh et al. (1994) com a variação de pH na solução filmogênica, associado a um aumento na força iônica ou a adição de íons, o que aumenta a solubilidade dos filmes, provocando uma variação na permeabilidade ao vapor d'água.

As proteínas do soro de leite expostas em diferentes condições de pH sofrem mudanças estruturais que interferem nas interações proteína-proteína relacionadas com a formação e propriedades finais dos filmes, como propriedades de barreira ao vapor d'água, propriedades mecânicas e outros (Pérez-Gago & Krochta, 1999). Em um estudo realizado por Anker et al. (1998), foram obtidos filmes a base de β -Lactoglobulina e isolado protéico de soro de leite em diferentes condições de pH, concluindo que esta variável exerceu um grande efeito nas propriedades finais dos filmes, onde em valores entre 4,0-6,0 os filmes caracterizavam-se pela opacidade e uma coloração branca; em pH menor que 4,0, eram frágeis; e em pH maior que 6,0, transparentes e flexíveis, contudo, em pH 10,0, a solução filmogênica tendia a apresentar uma coloração amarela forte. Em baixos valores de pH ($< 7,0$), as coberturas e filmes comestíveis possuem a vantagem de proteger o alimento do desenvolvimento de microrganismos, onde a maioria apresenta um crescimento favorável em pH ao redor da neutralidade e básico. Assim, a diminuição do pH da solução filmogênica pode proporcionar uma característica antimicrobiana ao filme (Zutara et al., 1998).

O tratamento térmico é uma etapa necessária para a formação de filmes comestíveis à base de proteína do soro de leite, provocando a desnaturação das proteínas, expondo os grupos sulfidrílicos, que formam as interações covalentes dissulfídicas, estando diretamente relacionadas com a estrutura molecular final dos filmes protéicos. Pérez-Gago et al. (1999) compararam a formação de filmes à base de proteínas do soro de leite, com e sem a aplicação do tratamento térmico, e obtiveram filmes frágeis e quebradiços sem o tratamento térmico, com uma matriz filmogênica

representada por uma estrutura desorganizada, formada principalmente por ligações de hidrogênio.

Filmes formados somente por ingredientes poliméricos tendem a ser quebradiços, principalmente em condições de baixa umidade relativa. Desta forma, adicionam-se agentes plastificantes nas formulações, com o objetivo de obter filmes mais flexíveis (Coupland et al., 2000). A adição do plastificante em materiais poliméricos modifica a organização tridimensional, decrescendo as forças atrativas intermoleculares, aumentando o volume livre e a mobilidade da cadeia protéica (Banker, 1966).

Os plastificantes, definidos como compostos de baixa volatilidade, com alto ponto de fusão, são adicionados com a finalidade de reduzir a fragilidade e aumentar a flexibilidade (Kester & Fennema, 1986), e atuam promovendo o decréscimo das forças intermoleculares entre as cadeias de proteína, diminuindo a rigidez da estrutura filmogênica, aumentando a mobilidade da matriz polimérica, e ocorrendo uma diminuição na força de coesão, força de ruptura e temperatura de transição vítrea (Gennadios & Weller, 1990). A redução nas forças entre as cadeias de proteínas aumenta o volume livre da matriz filmogênica, criando espaços que facilitam a migração da água e outras moléculas (Sothornvit & Krochta, 2000). Os mais utilizados são os mono-, di- e oligossacarídeos (glicose, xarope de frutose e mel); os polióis (sorbitol, glicerol, derivados de glicerol e polietileno glicol); lipídios (ácidos graxos, monoglicerídeos e derivados de éster, fosfolipídios e surfactantes). Devem ser compatíveis com os polímeros e, se possível, miscíveis no solvente (Guilbert, 1986; Krochta & De Mulder-Johnston, 1997).

A adição de plastificantes provoca mudanças significativas nas propriedades de barreira dos filmes, devido a sua natureza hidrofílica (Dohnowe & Fennema, 1994). O glicerol é o plastificante mais utilizado na formulação de filmes comestíveis; sua estrutura pequena permite que se insira entre as cadeias protéicas facilmente, e assim exerce uma maior influência nas propriedades mecânicas dos filmes do que plastificantes de estrutura maior, como polietilenoglicol (Yang & Paulson, 2000b). Fairley et al. (1996) observaram que com um pequeno aumento na concentração de glicerol em filmes a base de proteínas de soro de leite, obtém-se um aumento na porcentagem de alongação. McHugh & Krochta (1994a) fizeram uma comparação de filmes a base de soro de leite, utilizando diferentes

plastificantes, sorbitol e glicerol, e observaram melhor atuação do glicerol quanto à permeabilidade ao oxigênio; entretanto, o sorbitol apresentou melhores resultados em relação a resistência à ruptura, porcentagem de alongação e módulo de elasticidade.

Os grupos polares (-OH) presentes nas cadeias dos plastificantes facilitam a formação de pontes de hidrogênio entre polímero-plastificante reduzindo as ligações polímero-polímero nos filmes (Gennadios et al., 1993b). Assim, o tamanho molecular, a configuração e o número total de grupos hidroxil funcional, a compatibilidade com o polímero são fatores que influenciam as interações do polímero e plastificante (Yang & Paulson, 2000a). Deve-se ressaltar que a molécula de água presente na matriz filmogênica atua também como plastificante em filmes hidrofílicos e isto explica a característica de filmes protéicos tornarem-se mais quebradiços em condições de baixos valores de umidade (Coupland et al., 2000).

De uma forma geral, as características finais, como propriedades de barreira à umidade e gases, solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes protéicos são importantes na avaliação para a utilização como embalagens, e estão diretamente relacionadas com a formulação e processo de obtenção.

2.4 – Propriedades de Barreira

Os filmes devem atuar como barreira contra umidade, gases e lipídios. A umidade em alimentos é um fator importante para manter o frescor, inibir o desenvolvimento microbiano e proporcionar sabor e textura (Krochta & De-Mulder Johnston, 1997). O controle da migração de umidade é um fator crítico para a qualidade dos alimentos, devendo assegurar a estabilidade microbiana, propriedades físicas, sensoriais e químicas que conduzem ao aumento da vida de prateleira. Diversos princípios podem ser utilizados para inibir esta troca de umidade, como alterações na condição de atividade de água, na difusividade da água, na viscosidade (mobilidade molecular) das fases amorfas, e também a aplicação de filmes comestíveis entre ingredientes (Labuza & Hyman, 1998).

As propriedades de barreira dos filmes dependem da estrutura do polímero, plastificante, tipo de solvente, aditivos e outros fatores relacionados à dissolução do filme, permeabilidade e propriedades de difusão. Estas propriedades podem ser influenciadas pela espessura do filme, seleção e concentração de plastificante (Banker, 1966). De acordo com Cuq et al. (1996), a espessura é um parâmetro significativo nas propriedades de barreira, sendo que no estudo realizado em filmes a base de proteínas miofibrilares de peixe, concluiu-se que a espessura é inversamente proporcional à permeância de vapor d'água, ou seja, o aumento nesta variável provocou uma diminuição linear na permeabilidade ao vapor d'água. Algumas hipóteses têm sido propostas para este efeito da espessura, tais como, a modificação estrutural nas macromoléculas durante a formação dos filmes devido a variações durante a secagem (Donhowe & Fennema, 1993), o intumescimento da matriz filmogênica decorrente das forças atrativas entre o filme e moléculas de água, que alteram a estrutura (Banker et al., 1966, citado por McHugh et al., 1993), o efeito da condição externa de umidade relativa ou seja, modificações estruturais na interface ar-filme (McHugh et al., 1993; Cuq et al., 1996).

Os filmes a base de proteínas apresentam melhores propriedades de barreira que filmes de polissacarídeos, devido à estrutura específica das proteínas, que contém 20 monômeros diferentes, enquanto os polissacarídeos são homopolímeros, e também por possuírem diversas propriedades funcionais, principalmente de apresentarem um potencial alto de ligações intermoleculares, ou seja, podem formar ligações em diferentes posições, com diferentes tipos de energia em função da temperatura, condições de solvatação, pH e características de incorporar outros componentes (plastificantes, agentes de ligação e outros) (Guilbert & Graille (1994), citado por Cuq et al., 1995).

Filmes a base de proteínas promovem boa propriedade de barreira a gás carbônico e oxigênio, mas não para umidade. A deterioração dos alimentos promovida pela oxidação e respiração pode ser controlada através do uso de filmes comestíveis, estando diretamente relacionada à permeabilidade a oxigênio e gás carbônico (Chen, 1995). Filmes a base de proteínas apresentam propriedades de barreira ao oxigênio, devido a suas estruturas ordenadas de ligações de hidrogênio e baixa solubilidade, ao contrário de filmes a base de lipídios que apresentam propriedades de barreira baixas para oxigênio, devido à presença de poros microscópicos (McHugh & Krochta, 1994c). O

aumento da coesão entre as cadeias de proteínas melhora as propriedades de barreira dos filmes, ou seja, a reação cruzada de proteínas promovida por tratamento químico, enzimático ou físico produz filmes com propriedades de barreira e mecânicas mais eficazes.(Whitaker, 1977). Guilbert (1986) associou a formação de um filme com boa propriedade de barreira à formação de reações cruzadas do polímero que o constitui.

Filmes comestíveis protéicos apresentam característica hidrofílica, onde a modelagem do transporte de massa através dos filmes é complexa. O fluxo de vapor de água em filmes hidrofílicos varia não linearmente com o gradiente de pressão parcial de vapor d'água, tornando a permeabilidade ao vapor d'água uma propriedade não característica de filmes hidrofílicos (PARK et al., 1993). Segundo Avena-Bustillos & Krochta (1993), a natureza hidrofílica das proteínas formadoras dos filmes comestíveis induz a interação com a água, aumentando a permeabilidade ao vapor d'água. As propriedades de barreira dos filmes protéicos podem ser ajustadas para a aplicação em alimentos específicos através do estudo da permeabilidade, permitindo prever a vida de prateleira dos produtos (McHugh & Krochta, 1994b)

2.4.1 - Permeabilidade

A permeabilidade é definida como a transferência de um material penetrante (permeante) através da resistência do produto, ativada pela difusão, ou seja, o permeante dissolve-se na matriz filmogênica no lado de maior concentração, difunde-se através da superfície, devido a um gradiente de concentração, e então é evaporado do outro lado da superfície (Kester & Fennema, 1986). Experimentalmente, a permeabilidade pode ser determinada de acordo com a seguinte equação :

$$\text{Permeabilidade} = \frac{M_p \times L}{A \times t \times \Delta p} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde, M_p é a quantidade de penetrante que passou pela superfície, avaliado por diferença de peso (g); L, a espessura do filme (mm); A, a área da superfície do filme (m^2); t, o tempo (h); Δp , a diferença de pressão parcial através do filme (kPa).

Segundo Krochta & De-Mulder Johnston (1997), permeabilidade é a medida da tendência de adsorver, transferir e desorver um permeante (por exemplo, vapor de água ou oxigênio) de um lado do filme para outro, quando os dois lados de material filmogênico estão expostos a diferentes concentrações de permeante.

A permeabilidade através do filme comestível depende dos seguintes fatores, segundo McHugh & Krochta (1994d):

- Natureza química do polímero: polímeros altamente polares, como algumas proteínas e polissacarídeos que apresentam alto grau de pontes de hidrogênio, resultam em baixos valores de permeabilidade a umidade.
- Natureza estrutural do polímero: cadeias poliméricas com grupos volumosos e pouco emaranhadas provocam um aumento na permeabilidade.
- Natureza do permeante: moléculas grandes não favorecem a dissolução e difusão através do filme comestível. Moléculas polares difundem-se mais rápido que moléculas não polares através de filmes polares, isto ocorre devido ao aumento da solubilidade das moléculas polares.

Pode-se concluir que a permeabilidade é função da relação entre filme e permeante em condições definidas de temperatura, umidade relativa, espessura e diferença de pressão (Carvalho , 1997).

2.4.1.1 - Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água é definida como a taxa de vapor de água transmitida através da unidade de área do filme com uma unidade de espessura induzida pela diferença de pressão de vapor entre as duas superfícies, sob dada condição de temperatura e umidade relativa. Para uma avaliação precisa da eficácia do filme quanto a esta propriedade, deve-se conhecer a propriedade de atividade de água do sistema. A transferência de umidade ou vapor de água ocorrerá em alimentos quando existir um gradiente de atividade de água, indiferente do teor de umidade individual dos componentes do alimento (Kamper & Fennema, 1985).

Segundo Debeaufort et al. (1993), a difusão do vapor de água não depende somente da diferença de pressão de vapor d'água entre as duas faces do filme, mas também de outros fatores do processo de permeação como, condições ambientais (temperatura e umidade relativa), teor de umidade, espessura e estrutura do filme. McHugh et al. (1994) estudaram a influência de outros fatores como, tratamento térmico, concentração de proteína, pH, aplicação de vácuo na solução filmogênica (retirada de bolhas de ar) na permeabilidade a vapor d'água em filmes compostos por proteínas de soro de leite, concluindo que, o tratamento térmico e a concentração de proteína não apresentaram influência, ao contrário da variação de pH, concentração de plastificante e aplicação de vácuo, que alteraram a permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

Em um estudo realizado por McHugh & Krochta (1994e), analisando o efeito da umidade relativa do ambiente externo na permeabilidade a vapor d'água em filmes protéicos a base de soro de leite, concluíram que a umidade relativa tem um efeito exponencial na permeabilidade ao vapor d'água, que foi reduzido quando adicionaram lipídio na solução filmogênica, o que pode ser explicado pelo aumento da hidrofobicidade que o lipídio promoveu na emulsão filmogênica. Assim, quanto maior a cadeia lipídica e maior a concentração de ácidos graxos, menor será a permeabilidade a vapor d'água (Park et. al., 1994)

Estudando o efeito das ligações dissulfídicas presentes na estrutura filmogênica, Gennadios & Weller (1990) verificaram a importância delas na formação dos filmes a base de proteína do trigo (glúten). Estas ligações promoveram uma reação cruzada intermolecular, resultando em uma estrutura de alto peso molecular, favorecendo a propriedade de barreira a vapor de água (Miller et al., 1997).

A permeabilidade a vapor d'água varia bastante com a composição e orientação das moléculas (Kamper & Fennema, 1984). Através de uma reação cruzada, pode-se reduzir a mobilidade segmental do polímero de proteína e a solubilidade em água, diminuindo a permeabilidade ao vapor de água e gases. Outro fator importante é o ajuste do pH com o objetivo de otimizar a interação proteína-proteína, modificando a configuração, influenciando nas propriedades de transferência de massa no filme (Avena-Bustillos & Krochta, 1993).

Filmes a base de proteínas apresentam valores de permeabilidade ao vapor d'água relativamente altos, associados à característica hidrofílica das proteínas e/ou a concentrações altas de plastificante presente nas soluções filmogênicas. Filmes formados a partir de emulsões protéicas apresentam boa propriedade de barreira a vapor de água, ou seja, baixos valores de permeabilidade (McHugh & Krochta, 1994d).

O método gravimétrico pode ser utilizado para avaliar a permeabilidade ao vapor d'água, e consiste em acondicionar o filme em um ambiente com uma diferença de pressão parcial de vapor d'água, determinando experimentalmente o fluxo de vapor d'água que atravessa o filme, caracterizado pelo ganho de massa em função do tempo do processo de transferência de umidade. Através desta relação obtém-se o coeficiente angular da reta correspondente à razão de transferência de vapor d'água (Chen, 1995).

2.4.2 – Solubilidade

A solubilidade é uma propriedade importante em filmes comestíveis, pois algumas aplicações requerem insolubilidade em água mantendo a integridade do produto. Mas, em alguns casos, a solubilidade em água é requerida para aplicação (Pérez-Gago & Krochta, 2001). A insolubilidade dos filmes a base de proteínas do soro de leite está relacionada com a estabilização da matriz filmogênica por ligações covalentes dissulfídicas (CUQ et al., 1998). O grau de desnaturação das proteínas interfere na solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes, pois está diretamente relacionada ao grau e natureza das reações cruzadas entre as cadeias protéicas (Pérez-Gago & Krochta, 2001). Outro fator importante, segundo Mangino (1984), é a energia livre da interação da proteína com o solvente, que deve ser menor do que das interações proteína-proteína e solvente-proteína.

2.4.3 – Isotermas de sorção

O controle do teor e migração de umidade é um ponto crítico na qualidade de alimentos, e estão diretamente relacionados com o teor de umidade e a atividade de água

de cada componente em um sistema multicomponente. A migração de umidade ocorre devido à necessidade do sistema alcançar o equilíbrio de atividade de água (termodinâmico) e ao processo de transferência de massa (difusão) (Labuza & Hyman, 1998). A atividade de água (a_w) é definida como a razão da pressão parcial da água (p) em equilíbrio com o alimento na pressão parcial da água pura (p_o), sob a mesma temperatura (Eq.2).

$$a_w = \frac{p}{p_o} \quad (\text{Eq. 2})$$

A atividade de água combinada com a temperatura e o pH, é um parâmetro determinante quando se estudam taxas de mudanças químicas, bioquímicas e microbiológicas em produtos alimentícios (Fox & McSweeney, 1998).

As propriedades de barreira em filmes estão diretamente relacionadas com o coeficiente de difusão e a solubilidade em água da matriz filmogênica. Uma das maneiras de caracterizar a solubilidade é analisar as isotermas de sorção (McHugh & Krochta, 1994d). Segundo Coupland et al. (2000), a determinação das isotermas de sorção em alimentos fornece uma boa indicação da estabilidade durante a estocagem e descrevem a relação entre a umidade relativa de equilíbrio de um produto em função do seu teor de umidade a uma dada temperatura. De uma outra forma, é a predição da capacidade de o produto adsorver ou dessorver água.

As isotermas de sorção fornecem informações sobre a interação da água com o produto e, no caso de filmes comestíveis e coberturas, caracterizam a solubilidade da água na matriz filmogênica, estando relacionadas com a propriedade de barreira ao vapor d'água (Ayranci, 1996). Um fator importante na construção das isotermas de sorção é a temperatura, que está associada com a mobilidade das moléculas de água e o equilíbrio dinâmico entre o vapor e a fase adsorvida. Para um valor de atividade de água constante, o aumento na temperatura provoca uma diminuição na quantidade de água adsorvida, indicando que o alimento torna-se menos higroscópico. E para um teor de umidade constante, o aumento na temperatura promove uma maior atividade de água, favorecendo a perda da qualidade do produto (Kapsalis, 1987).

As isotermas de sorção de produtos alimentícios, geralmente, apresentam-se sob a forma sigmoïdal, onde a adsorção de umidade aumenta moderadamente sob pressões de vapor baixas e intermediárias, e em valores altos, a adsorção de umidade aumenta exponencialmente (Wiles et al., 2000; Kinsella, 1984).

Existem inúmeras equações utilizadas para representar as curvas de sorção de alimentos, sendo que algumas delas estão apresentadas abaixo (Jowitt et al., 1983; Rizvi 1995):

- **Equação de GAB** (Guggenheim-Anderson-De Boer): é um modelo de três parâmetros, fisicamente significativos, e tem sido sugerido como o modelo matemático mais versátil para a sorção de alimentos. É expressa da seguinte forma:

$$X = \frac{X_m C_G K a_w}{(1 - K a_w) (1 - K a_w + C_G K a_w)} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde, C_G é a constante de Guggenheim:

$$C_G = c \exp \left(\frac{(H_m - H_n)}{RT} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

sendo que, H_m é o calor total de sorção da primeira camada; H_n é o calor total de sorção das multicamadas; c é a constante da equação; T é a temperatura absoluta; R é a constante universal dos gases; K é a constante da equação:

$$K = k \exp \left(\frac{(H_l - H_n)}{RT} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

sendo que, H_l é o calor de condensação da água pura; X_m é o teor de umidade correspondente à saturação de todos os sítios de adsorção primários por uma molécula de água (teor de umidade na monocamada).

As vantagens encontradas para esta equação são a descrição do comportamento de sorção abrangendo uma faixa de atividade de água entre 0,1 e 0,9; a forma matemática simples, com parâmetros que possuem significados físicos; e a capacidade de descrever alguns efeitos da temperatura (Rizvi, 1995).

- **Equação de BET** (Brunauer-Emmett-Tetter): fornece um bom ajuste para uma variedade de alimentos na região de atividade de água entre 0,05 e 0,45, sendo expressa da seguinte forma:

$$\frac{a_w}{(1-a_w)} \frac{1}{X_{bs}} = \frac{1}{X_m C'} + \frac{a_w (C'-1)}{X_m C'} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde, a_w é a atividade de água; X_{bs} é o teor de umidade (base seca); X_m é o teor de umidade da monocamada; C' é a constante relacionada ao calor de sorção, sendo,

$$C' = k' \exp \left(\frac{\Delta H_{BET}}{RT} \right) \quad (\text{Eq.7})$$

sendo que, ΔH_{BET} é a entalpia de absorção da monocamada e k' é constante da equação.

- **Equação de Halsey**: foi desenvolvida supondo-se que, a condensação ocorre em multicamadas, assumindo que o potencial de energia da molécula varia inversamente com uma distância (r) da superfície, resultando na seguinte equação, sendo que P_H e r são parâmetros da equação, e $\theta = X_m/X$

$$a_w = \exp \left(\frac{-P_H}{RT\theta^r} \right) \quad (\text{Eq.8})$$

O valor do parâmetro r está relacionado com a interação solvente-adsorvido. Iglesias & Chirife (1976b) reconheceram que o uso do termo RT não eliminava a dependência de P_H e r com a temperatura, simplificando a equação de Halsey, tornando-a:

$$a_w = \exp \left(-\frac{S_h}{X^r} \right) \quad (\text{Eq.9})$$

sendo que, S_h e r são parâmetros da equação.

Gennadios & Weller (1994) obtiveram bons resultados utilizando a equação de GAB para ajustar as isotermas de zeína de milho, glúten de trigo e filme protéico zeína-glúten.

O conceito de teor de umidade da monocamada (X_m), que consiste na quantidade de água requerida para cobrir todos os sítios ativos primários, tem sido bastante estudado em alimentos, devido à sua relação com a estabilidade química e física de alimentos desidratados (Coupland et al., 2000).

Polímeros hidrofílicos, como as proteínas, contêm grupos polares que permitem a formação de pontes de hidrogênio, absorvendo água do ambiente, assim a presença de vapor d'água na matriz polimérica altera a permeação de gases, onde uma alta sorção de água provoca uma maior taxa de permeação, uma vez que a molécula de água atua como plastificante na matriz filmogênica e aumenta o volume livre do polímero. Pode-se concluir que as isotermas de sorção indicam o comportamento dos filmes protéicos quanto à propriedade de barreira em diferentes condições de umidade relativa (Kim & Ustunol, 2001b).

O mecanismo de sorção e difusão em polímeros têm grande importância na interpretação do fenômeno de transporte em alimentos, ou seja, como o transporte de água pode influenciar na performance de produtos alimentícios durante seu processamento e uso (Peppas, 1994). Filmes comestíveis, normalmente, contêm componentes hidrofílicos como proteínas, polissacarídeos, que promovem uma característica sensível à água. Segundo Watt (1983), dois fatores influenciam a sorção de água em compostos a base de proteínas, a estrutura do polímero e a capacidade de sítios hidrofílicos ligarem-se à água. O mecanismo de transporte de vapor d'água nos filmes é complexo, devido à não linearidade de suas isotermas de sorção e da difusividade ser dependente do teor de umidade (Wiles et al., 2000; Lim et al., 1998).

2.4.3.1 – Calor isostérico de sorção

O estudo do efeito da temperatura nas isotermas de sorção também permite determinar o calor de sorção em diferentes valores de umidade e prever as isotermas em outras temperaturas. O calor isostérico de sorção (Q_{st}) é um parâmetro termodinâmico, e representa a diferença entre a entalpia da água na fase vapor e a entalpia parcial da água líquida adsorvida no sólido, a uma dada concentração, ou seja,

corresponde à quantidade de energia necessária para evaporar a água adsorvida na fase sólida. O cálculo do calor de sorção pode ser feito através da Equação de Clausius-Clapeyron, que relaciona a mudança de atividade de água com a temperatura:

$$\left. \frac{\partial \ln(p/p_o)}{\partial(1/T)} \right|_x = \left. \frac{\partial \ln(a_w)}{\partial(1/T)} \right|_x = - \left(\frac{Q_{st} + \Delta H_{vap}}{R} \right) \quad (\text{Eq.10})$$

onde R é a constante universal dos gases, T, a temperatura absoluta, p a pressão de equilíbrio; ΔH_{vap} é o calor de vaporização da água pura. Integrando a equação entre as temperaturas T_1 e T_2 , respectivamente:

$$\ln \left(\frac{a_{w2}}{a_{w1}} \right) \Big|_x = - \frac{q_{st}}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (\text{Eq.11})$$

onde q_{st} é o excesso de calor de sorção,

$$q_{st} = Q_{st} - \Delta H_{vap} \quad (\text{Eq.12})$$

Quando os dados de atividade de água versus o inverso da temperatura absoluta são plotados em escala semi-logarítmica, obtém-se, em geral, uma reta, para cada condição de umidade da amostra, e o coeficiente angular corresponde $-q_{st}/R$. Se as retas isostéricas tenderem a uma ligeira forma curvilínea, indica uma baixa dependência do excesso de calor isostérico com a temperatura (Falabella et al., 1989).

O teor de umidade de equilíbrio e o calor isostérico de sorção são propriedades essenciais para a análise de vários processos na indústria de alimentos, como preservação, secagem, estocagem, embalagem. As isotermas de sorção permitem a avaliação do teor de umidade residual ótimo de produtos visando aumentar sua estabilidade. O calor isostérico de sorção pode estimar a energia necessária em processos de desidratação. O nível de teor de umidade no qual o calor de sorção aproxima-se do calor latente de vaporização da água, geralmente indica a quantidade de água existente na monocamada do alimento (Kiranoudis et al., 1993).

2.5 – Propriedades Mecânicas

Os filmes protéicos devem manter a integridade durante o manuseio, embalagem e transporte, sendo necessário que apresentem resistência mecânica e capacidade de deformação plástica. As principais propriedades mecânicas de filmes são a tensão na ruptura, flexibilidade, estabilidade a mudanças de temperatura, e resistência em diferentes condições ambiente e em situações com aplicação de forças físicas (Debeaufort et al., 1998; Guilbert, 1986).

As propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas com a distribuição e concentração das interações inter e intramoleculares na estrutura filmogênica entre as cadeias de proteínas, que são estabilizadas por ligações covalentes, pontes de hidrogênio, interações iônicas e forças de Van der Waals. Quando ligações covalentes estabilizam a matriz filmogênica ou quando a densidade de energia de ligação é alta, os filmes apresentam grande resistência e elasticidade (Ayhllon-Meixueiro et al., 2000; Cuq et al., 1998).

A tensão na ruptura expressa a máxima tração desenvolvida no filme ao esticá-lo, indica a medida de integridade e o potencial para o uso prolongado. A medida desta propriedade é feita através do máximo pico de força obtido (ao esticar) dividido pela área da secção transversal do filme, antes de romper. A porcentagem de alongação na quebra corresponde a capacidade do filme estender, é medida no ponto onde o filme quebra, e expressa como porcentagem da variação do comprimento inicial do filme. Uma alta porcentagem de alongação indica que o material absorve uma grande quantidade de energia antes de quebrar (Robertson, 1993; Gennadios et al., 1993b).

A integridade dos filmes e a ausência de defeitos podem ser garantidas através de propriedades mecânicas adequadas (Chen, 1995). O comportamento mecânico está diretamente relacionado com a formulação utilizada (Sabato et al., 2001). Altas concentrações de proteína promovem a formação de filmes com a presença de poros, que interferem diretamente nas propriedades mecânicas. Ao adicionar uma grande concentração de plastificante na formulação filmogênica, ocorrem mudanças significativas nas propriedades mecânicas dos filmes, aumentando a capacidade de estender e a

flexibilidade, mas decrescendo a coesão, a resistência mecânica e a rigidez (Cuq et al., 1997). E a mudança no pH induz a repulsão eletrostática das cadeias protéicas, reduzindo a interação proteína-proteína, produzindo filmes mais frágeis.

Filmes hidrofílicos, a base de proteínas e polissacarídeos, apresentam boas propriedades mecânicas e barreira a gases, aroma e lipídios, ao contrário de filmes lipídicos, que se caracterizam por uma excelente barreira a umidade, mas baixas propriedades mecânicas (Yang & Paulson, 2000a).

2.6 – Difusão em Filmes

O estudo do mecanismo de sorção de água e de difusão em polímeros é de grande importância na interpretação de fenômeno de transporte de alimentos (Peppas, 1994). A transferência de umidade ocorre devido a uma diferença no potencial químico entre a condição ambiente e o filme, ou entre o alimento e o filme. Em filmes protéicos, as moléculas de água alteram propriedades como a capacidade de plastificar, o intumescimento e a solubilidade, que estão diretamente relacionadas com a propriedade de barreira ao vapor d'água (Morillon et al., 2000).

A difusão de umidade é uma propriedade importante em diversos processos alimentícios como: embalagem, secagem, rehidratação e estocagem. Três métodos experimentais têm sido aplicados para a determinação da difusividade de umidade em alimentos, a secagem, a cinética de sorção e a permeabilidade (Karathanos et al., 1990). O processo de difusão em filmes protéicos está relacionado com a característica de permeabilidade ao vapor d'água, que consiste em um processo de solução e difusão.

O fluxo difusivo (J) de um penetrante no polímero pode ser definido como a quantidade de penetrante (Q) que atravessou uma superfície pela área superficial (A) na direção do fluxo, durante um tempo (t), independente do estado de agregação do polímero (Rogers, 1985).

$$J = \frac{Q}{A t} \quad (\text{Eq. 13})$$

A equação acima, escrita em termos de gradiente de concentração, em qualquer ponto ou plano fica expressa da seguinte forma:

$$J = -D \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (\text{Eq. 14})$$

onde, D é o coeficiente de difusão, expresso em cm^2/s ou m^2/s ; e, x é a coordenada normal referente ao plano atravessado pelo fluxo. Esta relação é conhecida por 1ª Lei de Fick (Crank, 1975).

A taxa de mudança na concentração do penetrante em qualquer ponto do plano ($x > 0$) é expressa na forma da (Eq. 15). Esta é a equação diferencial fundamental para a difusão unidirecional, onde $C=C(x,t)$ é a concentração mássica de umidade (Crank, 1975),

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Eq. 15})$$

Para resolver a equação parcial de difusão, deve-se conhecer a condição inicial e as condições de contorno, onde a inicial corresponde à concentração de umidade que atravessa o filme, na direção do fluxo no tempo $t = 0$ (C_0); e as condições de contorno são os valores das concentrações de umidade nas superfícies do filme durante o experimento (C_s).

A solução da (Eq. 15) para uma placa plana, obtida pelo método de séries de Fourier utilizando a propriedade de separação de variáveis, com o coeficiente de difusão constante, e as condições de contorno $C(x=\pm L, t) = C_s$ é dada por Crank (1975)

$$\frac{C(x,t) - C_0}{(C_s - C_0)} = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \exp\left(\frac{-D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4L^2}\right) \cos\left(\frac{(2n+1)\pi x}{2L}\right) \quad (\text{Eq. 16})$$

e a sorção ocorre por uma membrana na região $-L \leq x \leq L$, sendo L a espessura da placa.

Se M_t é a quantidade total de umidade difundida na placa plana após um tempo t , e M_∞ a quantidade correspondente após um tempo infinito (estado estacionário), tem-se a seguinte equação (Crank, 1975)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp\left(\frac{-D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4L^2}\right) \quad (\text{Eq.17})$$

O transporte do penetrante através de uma membrana homogênea, na ausência de poros, falhas, furos, geralmente ocorre através do seguinte processo: primeiro a condensação e mistura do vapor nas camadas superficiais, seguida da migração até a superfície oposta sob um gradiente de concentração (potencial químico) (Rogers, 1985; Jenke, 1992). As propriedades dos polímeros, como a sua natureza química, a distribuição do peso molecular, o grau de reação cruzada, a natureza do plastificante; as propriedades de permeante (peso e forma molecular) e as interações entre as moléculas do soluto e polímero são variáveis importantes no processo difusivo.

O coeficiente de difusão de um gás em um polímero é uma propriedade do sistema e varia com a temperatura, pressão, natureza do gás e natureza do polímero. Segundo Labuza & Hyman (1998) e Peppas (1994), depende da estrutura da matriz (peso molecular, grau de reação cruzada e ramificação do polímero, coeficiente de expansão térmica do polímero e do solvente) e solubilidade em água. A estrutura do sólido e sua interação com o soluto difundido apresentam grande influência no processo de difusão e na taxa de transporte. A solubilidade do penetrante no polímero depende da natureza das interações polímero-penetrante, polímero-polímero e penetrante-penetrante, assim como da distribuição e tipo dos espaços vazios formados na cadeia polimérica (Theodorou, 1996).

O processo de difusão está relacionado com a estrutura física do sólido, e segundo Labuza & Hyman (1998), o tamanho dos poros presentes na matriz polimérica é um fator importante na difusão, ou seja, o quanto tortuoso é o caminho percorrido. Defeitos na estrutura e morfologia da cadeia polimérica, como espaços vazios e microfissuras, favorecem o processo de difusão de vapor d'água através dos filmes (Rogers, 1985).

O transporte da água através dos filmes comestíveis é um mecanismo complexo, devido às isotermas de sorção apresentarem uma forma sigmoideal, ou seja, o fluxo de água varia não linearmente com a diferença de pressão de vapor (Morillon et al., 2000; McHugh et al., 1993). A difusão em polímeros é controlada pela temperatura, composição, características morfológicas (cristalinidade e ligação cruzada) que podem reduzir a mobilidade molecular (Theodorou, 1996).

O comportamento difusivo de polímeros é influenciado pela mudança da estrutura da matriz polimérica relacionada à solubilidade e à mobilidade difusional do permeante (Crank, 1975). O intumescimento altera a microestrutura de filmes poliméricos, aumentando a sorção de umidade e abrindo a estrutura polimérica, o que permite o aumento no fluxo de permeante, da solubilidade de vapor d'água e conseqüentemente da permeabilidade ao vapor d'água (Rogers, 1985; Wiles et al., 2000). Os aditivos alteram as características no processo de difusão, pois estão diretamente relacionados com a formação de volume livre no sistema. A adição de plastificante aumenta significativamente o volume livre, tendendo a aumentar a taxa de migração molecular. A adição de substâncias sólidas ou impermeáveis pode não alterar a formação de volume livre, mas pode provocar a diminuição na difusividade devido ao efeito da tortuosidade, ou seja, dificulta o caminho percorrido pela molécula (Theodorou, 1996). Segundo Saravacos (1995), a adição de lipídios decresce a difusividade de umidade.

2.7 – Filmes Emulsionados

A permeabilidade ao vapor d'água decresce com o aumento da hidrofobicidade na matriz, assim a adição de lipídios (ácidos graxos, ceras e outros) na solução filmogênica melhora esta propriedade de barreira nos filmes comestíveis. A eficiência das propriedades de barreira de filmes emulsionados ou multicomponentes depende da polaridade dos componentes e da distribuição uniforme das substâncias hidrofóbicas na matriz e/ou na superfície (Kamper & Fennema, 1985; Debeaufort et al., 1993).

Os lipídios são utilizados devido ao seu caráter hidrofóbico, e a característica de promover brilho e melhorar o aspecto visual dos produtos alimentícios. A sua eficiência depende da estrutura química, grau de saturação, estado físico (sólido ou líquido), tamanho da cadeia, dimensão dos cristais e homogeneidade no filme (distribuição dos lipídios), ou seja, a interação da partícula lipídica com os outros componentes do filme, como proteínas ou polissacarídeos (Callegarian et al., 1997).

Lipídios podem ser incorporados na formulação de filmes protéicos na forma de filmes emulsionados ou bicamadas (o lipídio é aplicado sobre a camada de filme protéico). Filmes em bicamadas apresentam melhor propriedade de barreira, mas tendem a desenvolver deformações, como poros, fissuras, além de apresentarem baixa adesividade. Filmes emulsionados são obtidos através de uma homogeneização lipídica na solução protéica, formando uma emulsão. Estes filmes não apresentam uma propriedade de barreira tão eficaz como os filmes bicamada, mas caracterizam-se por melhores propriedades mecânicas (Sherwin et al., 1998)

Emulsões consistem em um sistema coloidal heterogêneo com pelo menos um líquido imiscível disperso em outro na forma de pequenas partículas, envolvidas por um filme contínuo de surfactante, que estabiliza a fase emulsionada (não contínua), evitando a floculação e coalescência. A estabilidade do sistema emulsionado depende do balanço entre as forças intermoleculares atrativas das moléculas no filme e as forças repulsivas na superfície externa. Agentes emulsificantes, geralmente são adicionados para a formação de uma emulsão estável, ou as partículas lipídicas são finamente quebradas através de uma homogeneização rigorosa. Em filmes protéicos multicomponentes (proteína-lipídio), a proteína atua como agente emulsificante. A estabilidade da emulsão é influenciada pela morfologia do filme, ou seja pelas características da fase contínua (viscosidade, pH, força iônica) e da fase dispersa (tamanho e densidade da partícula lipídica) (McHugh, 2000; Pérez-Gago & Krochta, 1999, Baldwin et al., 1997).

De acordo com McHugh (2000), filmes formados somente a base de lipídios, promovem uma boa barreira à umidade, mas frequentemente para a obtenção destes filmes é necessário a utilização de solventes orgânicos ou altas temperaturas, e apresentam baixas propriedades mecânicas. Gontard et al. (1995) encontraram

problemas na aplicação de filmes lipídicos em alimentos, como baixa adesão, característica heterogênea e quebradiça, susceptibilidade à oxidação e propriedades organolépticas não aceitáveis. A interação entre proteínas e lipídios na interface depende da homogeneização e tamanho da partícula lipídica (Jost et al., 1986).

2.7.1 - Formação dos filmes emulsionados

O filme emulsionado caracteriza-se pela presença de um lipídio na matriz contínua, que estabelece um caminho mais tortuoso ou um aumento na distância da difusão das moléculas quando comparada com uma matriz composta somente por substância hidrofílica (Koelsch, 1994). As proteínas atuam como surfactantes macromoleculares em emulsões, pois apresentam a característica de estabilizar, formando um filme viscoelástico na interface óleo-água. A formação deste depende de interações não covalentes, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, e ligações covalentes (dissulfídicas) entre as moléculas protéicas (Damodaran & Anand, 1997).

Na solução filmogênica, as proteínas são parcialmente imobilizadas na interface com as partículas lipídicas emulsionadas, ou seja, os segmentos poliméricos apresentam uma menor mobilidade, reduzindo a difusividade da água através da proteína interfacial, diminuindo a permeabilidade ao vapor d'água (McHugh & Krochta, 1994c). A afinidade lipídio-proteína depende da estrutura e polaridade dos mesmos, da concentração de lipídio, pH, força iônica, viscosidade e temperatura. A característica anfifílica promove interações entre lipídios e proteínas como resultado de um balanço de forças de diferente natureza, principalmente eletrostática e hidrofóbica (Callegarian et al., 1997).

A temperatura da solução interfere na formação de emulsões filmogênicas, onde mudanças nesta variável provocam alterações no estado físico dos lipídios. Algumas moléculas lipídicas apresentam baixa solubilidade em temperaturas baixas, mas tornam-se solúveis em temperaturas mais altas, promovendo a fusão da cadeia, o que permite a penetração da água na região hidrofílica formando cristais líquidos ou micelas (Martin-Polo et al., 1992).

A temperatura de secagem dos filmes é um outro fator importante, onde valores acima ou abaixo do ponto de fusão do lipídio alteram a deformabilidade e distribuição do lipídio na matriz polimérica, e reduzem a estabilidade da emulsão, devido a variações na viscosidade da fase contínua. O estudo realizado por Pérez-Gago & Krochta (2000) com filmes emulsionados de proteína de soro de leite mostrou uma maior homogeneidade e melhor aspecto visual quando a secagem foi feita em condições ambiente (25°C e umidade relativa de 40%).

Pérez-Gago & Krochta (1999) verificaram a influência do pH na formação dos filmes emulsionados à base de soro de leite, concluindo que quanto mais afastado do ponto isoelétrico (pI) das proteínas, menor a permeabilidade ao vapor d'água.

2.7.2 - Propriedades de barreira e mecânicas dos filmes emulsionados

A adição de lipídios na formulação filmogênica diminui a permeabilidade ao vapor d'água e promove uma perda nas propriedades mecânicas dos filmes. Estas propriedades em filmes compostos por polímeros e lipídios dependem do tipo, estrutura e quantidade de lipídios adicionada. No caso de filmes protéicos, a permeabilidade a gases e ao vapor d'água depende de diversos fatores como a integridade do filme, razão de zonas cristalinas e amorfas, proporção hidrofílica-hidrofóbica, mobilidade da cadeia polimérica e a interação da proteína com os outros componentes do filme (plastificante, aditivos e outros) (Garcia et al., 2000). A propriedade de barreira dos filmes lipídicos e emulsionados está relacionada à prevenção da transferência de umidade em alimentos com teores de umidade baixos e intermediários por um longo período, com a embalagem fechada e por um período menor, com a embalagem aberta (Shellhammer & Krochta, 1997).

Filmes emulsionados são formados através da homogeneização do lipídio na solução protéica concentrada, seguida do processo de secagem. Assim, obtém-se uma matriz protéica contínua com pequenas partículas de lipídio. A presença destas partículas nos filmes provoca um aumento na distância percorrida pelas moléculas de água durante a difusão, reduzindo a permeabilidade ao vapor d'água (Fairley et al., 1997). Sherwin et al. (1998) concluíram que o processo de homogeneização é uma etapa importante na

obtenção de filmes emulsionados, uma vez que o tamanho da partícula lipídica e a sua distribuição estão diretamente relacionados com a eficácia das propriedades dos mesmos.

Filmes a base de proteínas do soro de leite caracterizam-se por uma natureza hidrofílica, promovendo uma baixa barreira à umidade. A incorporação de lipídios em filmes protéicos, como uma emulsão ou como cobertura, vem sendo estudada com a finalidade de reduzir a permeabilidade ao vapor d'água (Debeaufort & Voilley, 1995). McHugh & Krochta (1994e) obtiveram filmes de proteínas do soro de leite ligadas à cera de abelha com menor permeabilidade ao vapor d'água; quando se aumentou a área superficial, através da diminuição do diâmetro das partículas lipídicas, foi obtida uma maior interação proteína-lipídio. Avena-Bustillos & Krochta (1993) obtiveram valores reduzidos de permeabilidade ao vapor d'água ao adicionar cera de abelha em filmes de caseinato de sódio. O mesmo resultado foi obtido por Sapru & Labuza (1994) em filmes a base de metilcelulose e ácido esteárico.

Os lipídios mais utilizados em filmes comestíveis são os ácidos graxos com cadeias carbônicas contendo 14 e 18 carbonos; mono-, di- e triestearina, óleos vegetais e ceras (cera de abelha, parafina, carnaúba) (Callegarian et al., 1997). Ceras, ácidos graxos saturados de cadeia longa e álcoois graxos são mais eficientes para promover barreira à umidade em filmes hidrofílicos, mas a incorporação dos mesmos acarreta em uma maior perda nas propriedades mecânicas e óticas dos filmes (Yang & Paulson, 2000a).

O tipo e a quantidade de ácido graxo influi nas propriedades do filme, como a dureza, retenção de cor, durabilidade e a velocidade de reação cruzada (Santosa & Padua, 1999). Em filmes contendo ácido graxo, a permeabilidade ao vapor d'água decresceu com o aumento da extensão da cadeia e o grau de saturação dos lipídios (Hagenmaier & Shaw, 1990). Ayranci & Tune (2001) compararam a eficiência na redução da permeabilidade ao vapor d'água, adicionando diferentes tipos de ácido graxo saturado (ácido esteárico, ácido palmítico e ácido láurico) em filmes de metilcelulose, sendo que o ácido esteárico apresentou melhores resultados. O ácido esteárico possui a maior cadeia de hidrocarbonetos, dentre os outros, é mais hidrofóbico e tem a menor mobilidade da cadeia. Koelsch & Labuza (1992) verificaram melhores propriedades de barreira, quando

se incorporou ácido esteárico em filmes de metilcelulose, sendo que foram estudados cinco tipos de ácido graxos e suas combinações.

Debeaufort & Voilley (1995) determinaram para filmes emulsionados a base de metilcelulose e parafina que a taxa de transferência de vapor d'água e as propriedades mecânicas são dependentes da formação da matriz filmogênica, e filmes que apresentaram uma distribuição mais homogênea e com menor diâmetro das partículas lipídicas, caracterizaram-se por melhores propriedades mecânicas e de barreira ao vapor d'água.

As propriedades mecânicas dos filmes dependem das interações entre os componentes, ou seja da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias. Alguns lipídios, como acetoglicerídios, ácidos graxos, monoglicerídios e fosfolipídios são utilizados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos, pois apresentam forças intermoleculares fracas entre as cadeias poliméricas adjacentes. A desvantagem é que aumentam a permeabilidade a gases através do filme (Callegarian et al., 1997).

2.8 - Modificação Enzimática nas Proteínas do Soro de Leite

A incorporação de ligações inter e intramoleculares através de ligações cruzadas em produtos alimentícios pode ser efetuada através de modificação química e enzimática. Estes procedimentos visam melhorar as propriedades físicas e de textura de alimentos, assim como propriedades funcionais de proteínas. A modificação enzimática é o processo mais aceitável devido ao seu caráter natural, não gerando produtos tóxicos através de sua reação e apresentando uma alta especificidade (Færgemand et al., 1998b; Nonaka et al., 1989; Matheis & Whitaker, 1987).

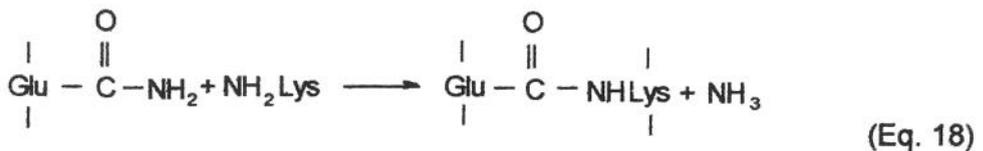
As proteínas na forma nativa, em alguns casos, não apresentam todas as propriedades funcionais desejáveis, tornando-se necessário promover modificações químicas, enzimáticas ou físicas. Estas modificações alteram a estrutura e estado de agregação de suas moléculas, com a introdução de novas ligações covalentes

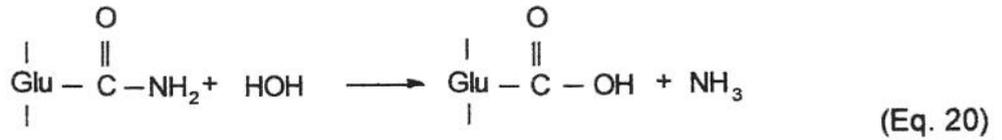
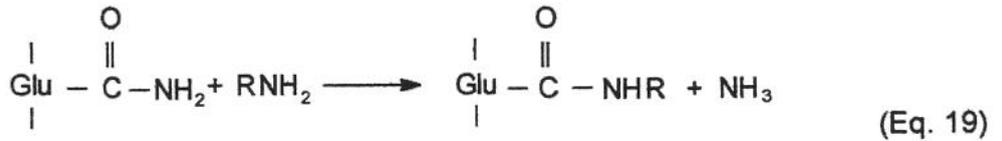
(Færgemand et al., 1997). Modificações químicas podem resultar em co-produtos ou reações não desejáveis (Yildirim et al., 1996). Assim, a modificação enzimática mostra-se vantajosa, uma vez que promove uma alteração suave, sem a destruição da proteína (Nonaka et al., 1997).

A modificação enzimática em proteínas pela catálise com transglutaminase não produz substâncias tóxicas, aromas indesejáveis ou perda significativa de nutrientes essenciais (Dickinson, 1997). Matheis & Whitaker (1987) afirmaram que a modificação de proteínas de alimentos pela enzima transglutaminase melhora a textura dos produtos, protege a lisina de reações químicas (por exemplo, reação de Maillard e peroxidação lipídica), forma filmes resistentes ao calor e água, promove elasticidade e capacidade de retenção de água em géis, modifica a solubilidade e propriedades funcionais.

2.8.1 - Transglutaminase

A transglutaminase promove reação cruzada inter e intramolecular em diferentes tipos de proteínas. Sua classificação consiste em EC 2.3.2.13, R-glutamil-peptídio: amina γ -glutamil transferase. Esta enzima catalisa a reação de acil transferência entre os grupos γ -carboxiamida dos resíduos peptídicos glutamina (doadores acil) e de aminas primárias (receptores acil), incluindo o grupo ϵ -amino da lisina em certas proteínas, formando ligações covalentes ϵ -(γ -Glu)-Lys (reação cruzada). Também pode catalisar a incorporação da amina primária no polipeptídio através da reação de substituição. E, no caso da ausência de substratos amina, a transglutaminase catalisa a deamidação de resíduos de glutamina, onde moléculas de água atuam como receptores acil. Em resumo, pode modificar proteínas através da reação cruzada (Eq.18), da incorporação de aminas (Eq. 19), e deamidação (Eq. 20), como pode ser visto abaixo (Motoki & Seguro, 1998; Han & Damodaran, 1996):





É difícil desenvolver um mecanismo modelo para a reação cruzada pela transglutaminase em proteínas, devido às diferentes reações que podem proporcionar. Estas dependem da ação e concentração da enzima, do tipo e conformação do substrato, pH, temperatura, tempo, concentração do substrato, presença de sais e outros (Nielsen, 1995).

Os substratos protéicos da reação com a transglutaminase são classificados em quatro grupos, baseados na facilidade de acesso dos resíduos de lisina e glutamina na superfície da proteína, sendo eles (Han & Damodaran, 1996):

- tipo Glu-Lys: avaliam-se resíduos de Glu e Lys
- tipo Glu: avaliam-se somente resíduos de Glu
- tipo Lys: avaliam-se somente resíduos de Lys
- tipo não reativo: não é possível avaliar os resíduos de Glu e Lys

Segundo Nielsen (1995), existem diferentes métodos para determinar a atividade da transglutaminase, tais como a incorporação de amina, desaparecimento de grupos amino, aumento do peso molecular, formação de NH_3 ou a medida das propriedades funcionais.

Um fator importante, segundo Han & Damodaram (1996), na formação de polímeros a partir da reação cruzada entre proteínas, é a compatibilidade termodinâmica que está relacionada com a natureza e a intensidade das interações entre duas macromoléculas. As proteínas apresentam compatibilidade limitada, diminuindo com a presença de superfícies polares e apolares, tendendo a criar forças de repulsão entre elas, aproximando-se entre si até o ponto onde a energia livre de interação entre duas

cadeias iguais a zero, criando um volume vazio que não é acessado por outras proteínas, no caso a enzima, conseqüentemente, dificultando sua ação.

A estrutura e a disposição dos resíduos lisil e glutamil nas cadeias protéicas devem ser consideradas também, onde a reatividade das proteínas pela enzima é dependente da distribuição dos resíduos de glutamina e lisina, e da estrutura secundária e terciária apresentadas (Matsumura et al., 1996).

A transglutaminase é largamente distribuída na natureza e encontrada em muitos organismos, em fígado e sangue de mamíferos, em peixes, sendo dependente da presença de Ca^{2+} para reagir (Færgeman & Qvist, 1997). Apresenta um custo elevado na extração e purificação, tornando impraticável e limitado o seu uso em larga escala (Schorsh et al., 2000). A alternativa encontrada foi a descoberta da enzima transglutaminase obtidas por fermentação com microrganismos (espécies de *Streptoverticillium*), que são independentes de Ca^{2+} (Motoki & Seguro, 1998). Segundo Matsumura et al. (2000), o fato da atividade da transglutaminase microbiana ser independente da presença dos íons cálcio proporciona uma vantagem na aplicação em alimentos que alteram seu estado físico na presença destes cátions, ou em casos de proteínas que tendem a precipitar na presença de baixas concentrações deste íon, por exemplo, a caseína (Dickinson, 1997).

A enzima transglutaminase derivada de microrganismo (TG microbiana) é caracterizada por apresentar uma cadeia polipeptídica simples, com peso molecular aproximado de 38000 Da, consistindo de 331 aminoácidos. Seu ponto isoelétrico está em torno de 8,9. É considerada uma proteína simples e monomérica, mas apresenta dois sítios ativos de glicosilação na estrutura primária (-Thr-Xxx-Asn). Não possui sítios ativos de Ca^{2+} , tomando-se assim, diferente das derivadas de mamíferos, que dependem da presença de Ca^{2+} . O centro ativo da enzima é o resíduo de cisteína, onde o grupo SH é envolvido em reação catalítica (Schorsch et al., 2000; Dickinson, 1997).

As propriedades de reação da transglutaminase derivada de microrganismos consistem em pH ótimo na faixa entre 5,0 e 8,0; contudo em pH 4,0 e 9,0, a enzima ainda apresenta alguma atividade enzimática. A temperatura ótima de reação é de 50°C. A

inativação é atingida em poucos minutos aquecendo a solução a 70°C. Deve-se ressaltar que a transglutaminase microbiana apresenta alguma atividade enzimática à 10°C e temperaturas próximas ao ponto de congelamento (Motoki & Seguro, 1998).

2.8.2 - Aplicação da transglutaminase

O efeito da reação cruzada pode ser aplicado para melhorar a textura, modificar a solubilidade, formar espuma e emulsão, além de promover propriedades nutricionais, evitando que a proteína sofra reações de Maillard (Nielsen, 1995). Ikura et al. (1980) observaram que o uso de transglutaminase na obtenção de produtos alimentícios protéicos promoveu novas propriedades funcionais e valores nutritivos, através da formação de complexos entre proteínas de diferentes fontes e pela introdução de amins primárias.

Segundo Matheis & Whitaker (1987), o uso da transglutaminase pode modificar as propriedades funcionais das proteínas, incluindo a solubilidade. Polímeros de proteína do soro de leite produzidos pela ação da enzima transglutaminase foram caracterizados por Mahmoud & Savello (1993) pelo aumento na capacidade de hidratar. Motoki et al. (1984) concluíram que o tratamento com esta enzima pode produzir novas formas protéicas para alimentos com característica de alta hidratação.

A polimerização das proteínas pode ser verificada pelo aumento do peso molecular, que segundo Yildirim et al. (1996), é proporcional ao tempo de reação em presença da transglutaminase. É importante ressaltar que o aumento no peso molecular está associado à reação cruzada intermolecular das proteínas. Como exemplos de proteínas estudadas e favoráveis à reação cruzada, utilizando transglutaminase microbiana, tem-se globulina leguminosa, glúten de trigo, proteínas da clara do ovo, actinas, miosinas, fibrinas, caseínas do leite, α -lactalbumina e β -lactoglobulina (Motoki & Seguro, 1998). A polimerização enzimática em proteínas do leite foi considerada por Lorenzen (2000), como uma nova ferramenta para modificar ingredientes, visando melhorar as propriedades funcionais.

2.8.3 - Aplicação em filmes comestíveis

A forma polimérica das moléculas determina os segmentos moleculares interligados e as propriedades físicas dos filmes. A ordem da cadeia influi na rigidez, permeabilidade, flexibilidade e fragilidade dos filmes (Banker, 1966).

A característica de proteínas ou carboidratos formarem filmes depende da estrutura química e como esta pode ser modificada para promover propriedades mecânicas e de barreira desejáveis. Segundo Kester & Fennema (1986), o aumento da coesão estrutural, resultado da formação de ligações inter e intramoleculares, promove propriedades de barreira mais efetivas a gases, vapores e solutos em filmes comestíveis.

A matriz filmogênica é resultado de interações covalentes e não covalentes entre os polímeros protéicos. Filmes a base de soro de leite são formados por ligações covalentes, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre monômeros, dímeros e polímeros de diferentes tamanhos. A transglutaminase catalisa a formação de ligações inter e intramoleculares entre as cadeias protéicas, resultando em uma distribuição ampla de polímeros de proteína (Mahmoud & Savello, 1993; Aboumahmoud & Savello, 1990).

A reação cruzada de proteínas do soro de leite pela reação catalisada por transglutaminase, pode ser utilizada para produzir filmes comestíveis com melhores propriedades, tais como maior resistência à solubilidade em tampões aquosos em diferentes valores de pH e tratamentos térmicos, associadas às interações covalentes e não covalentes formadas entre polímeros protéicos (Mahmoud & Savello, 1993). Motoki et al. (1984, 1987) promoveram a reação cruzada utilizando a transglutaminase em α_{S1} -caseína, para formar filme, observando a insolubilidade dos filmes em água e desnaturantes protéicos, contudo era hidrolisado pela quimiotripsina, e quanto à propriedade de tensão na ruptura, caracterizou-se por ser duas vezes maior que a em filmes sem a adição da enzima.

Os filmes de proteínas de soro de leite obtidos através da catálise por transglutaminase, em presença de cálcio, glicerol e em solução tampão (pH 7,5), foram estudados, observando-se que a enzima promoveu uma polimerização covalente das proteínas de soro de leite, induzindo uma gelatinização, que seguida de um processo de secagem, produziu filmes comestíveis (Grant & Burns, 1994). Os efeitos do pH, tempo de reação, temperatura e concentração de proteína são variáveis importantes na reação cruzada de proteínas do soro de leite, sendo adequado utilizar as condições ótimas de ação da enzima (Aboumahmoud & Savello, 1990).

Han & Damodaram (1996) estudaram a capacidade das proteínas α -lactalbumina (α -la), β -lactoglobulina (β -lg) e BSA na formação de um polímero ou dímero através da reação com transglutaminase microbiana, assim como a compatibilidade termodinâmica entre elas. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Habilidade das proteínas do soro de leite em formar polímeros ou dímeros a partir da reação com transglutaminase.

Proteína	Tipo de substrato	Reação cruzada com			Compatibilidade termodinâmica com		
		α -la	β -lg	BSA	α -la	β -lg	BSA
α -la	Glu-Lys	+		+	+	+	+/-
β -lg	Glu-Lys	+	+			+	
BSA	Glu ou Lys	+	-	-	+	-	+

Fonte: Han & Damodaran (1996).

As proteínas do soro de leite em seu estado nativo não apresentam uma alta reatividade a reações cruzadas, como as caseínas, pois as proteínas α -la e β -lg caracterizam-se por uma estrutura globular, compacta e com acesso limitado da transglutaminase em resíduos de glutamina e lisina (Nio et al., 1986; Mahmoud & Savello, 1992). Estudos verificaram a necessidade de promover uma desnaturação parcial destas proteínas através de redução química das ligações dissulfídicas, estabilizando a estrutura terciária, por adição de ditioneitol (DTT) ou alteração física, aumentando o pH da solução (Færgemand et al., 1998a). Porém, o uso de DTT não é aprovado na aplicação em produtos alimentícios (Lim et al., 1998).

Yildirim & Hettiarachchy (1998) promoveram a reação cruzada das proteínas de isolado protéico do soro de leite e 11S globulina, utilizando transglutaminase, na produção de filmes; concluindo que apresentaram melhores propriedades mecânicas, com a ressalva de que a eficácia dos mesmos depende da superfície a ser coberta, ou embalada, e a solubilidade dos filmes foi menor, estando diretamente relacionada ao pH e tempo de incubação, e em pH 8,0 apresentaram maior solubilidade.

Mahmoud & Savello (1992) estudaram as propriedades físicas dos filmes obtidos a partir da reação cruzada com a enzima transglutaminase em proteínas do soro de leite. Filmes a base de α -lactalbumina (α -la) apresentaram menor resistência à quebra que filmes a base de β -lactoglobulina (β -lg) e da mistura α -la: β -lg. Filmes de β -Lg apresentaram a maior resistência a quebra. Quanto a permeabilidade, filmes de α -La foram pouco mais permeáveis ao vapor d'água que filmes de β -Lg pura e filmes da mistura α -La: β -Lg apresentaram o maior valor de permeabilidade entre os três tratamentos.

2.9 – Aplicação de Filmes Protéicos

As características funcionais a serem consideradas para uma aplicação específica em alimentos dependem do produto e de seu modo de deterioração. Por exemplo, para proteger alimentos gordurosos de processos oxidativos seria indicado um filme resistente ao transporte de oxigênio; se o objetivo for retardar perda de umidade de frutas e vegetais, uma baixa permeabilidade ao vapor d'água e alguma permeabilidade de oxigênio e dióxido de carbono é desejada para que se evitem condições anaeróbicas (Antunes, 1996).

A demanda pelo consumo de alimentos frescos vem crescendo, reduzindo os processos industriais aplicados, ou seja, o aumento do interesse em frutas e vegetais minimamente processados. A maior perda de qualidade e quantidade de frutas e vegetais frescos ocorre no período entre a colheita e o consumo (Park, 1999). Alimentos minimamente processados incluem processos como lavagem, seleção, descascamento, corte, remoção de partes indesejáveis, e outros (Wong et al., 1994).

O metabolismo de alimentos minimamente processados continua ativo, aumentando a perecibilidade causada pela ruptura celular, aumentando a respiração, em consequência, reações provocam a mudança de cor, textura, aroma, desenvolvimento microbiano e produção de etileno. Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para reduzir a deterioração de alimentos minimamente processados, como a refrigeração, embalagem em atmosfera modificada, uso de aditivos e coberturas comestíveis (King & Bolin, 1989).

O controle da respiração em alimentos minimamente processados é uma forma de aumentar o tempo de armazenamento, e geralmente é feito através da estocagem em baixas temperaturas ou em embalagens em atmosfera modificada. Em frutas e vegetais, o acondicionamento em baixas concentrações de oxigênio, alta concentração de dióxido de carbono e a injeção de nitrogênio, tem apresentado bons resultados. É importante ressaltar que é necessária uma concentração mínima de oxigênio (1-3%) para manter a respiração aeróbica, e quanto ao CO₂, que inibe a ação de enzimas, em concentrações muito elevadas produz substâncias tóxicas (Role & Chism III, 1987).

Uma das principais funções da embalagem em alimentos é aumentar a vida-de-prateleira, através do controle de transferência de massa entre o produto e o ambiente (Baldwin et al., 1995; Blumenthal, 1997). Segundo Gallo et al. (1999), a perda de qualidade pode estar relacionada ao transporte de água, sais, pigmentos ou aromas, que fazem com que as indústrias utilizem embalagens de vidro, metal e plástico para proteger os produtos alimentícios. A embalagem deve reduzir as modificações, principalmente as que interferem na qualidade sensorial. Myers (1989) definiu embalagem como um sistema que protege produtos perecíveis de danos físicos causados pelo manuseio e desenvolvimento microbiológico em ambiente de alta temperatura e umidade relativa.

O plástico é largamente aplicado para embalar alimentos, mas geralmente o vapor d'água condensa na superfície interna, favorecendo a contaminação microbiológica em produtos frescos (Ben-Yehoshuas, 1985). Filmes e coberturas protéicas podem atuar como barreira semipermeável à umidade, gases e compostos aromáticos, controlando a transferência de massa (umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídio) em sistemas alimentícios, manter a integridade estrutural e propriedade de manuseio, reter compostos

aromáticos voláteis e transportar aditivos (Hershko & Nussinovitch, 1998), sendo utilizado como um complemento à embalagem sintética, prolongando a vida-de-prateleira garantindo maior qualidade do produto final, além de apresentar um potencial econômico, pois sua matéria-prima é de baixo custo e biodegradável (McHugh & Senesi, 2000; Maté & Krochta, 1998).

As embalagens alternativas devem garantir vantagens como o decréscimo do custo da embalagem, matéria-prima reciclável ou biodegradável, proteção após a embalagem aberta e o aumento do valor nutricional do produto (Maté & Krochta, 1998). A compatibilidade entre filme e alimento deve ser considerada quando se utiliza o filme protéico como embalagem, sendo que o filme não deve ser sensorialmente detectado durante o consumo. Kim & Ustunol (2001a) obtiveram bons resultados com filmes a base de isolado protéico de soro de leite, ressaltando a formação de filmes transparentes, o que favoreceu sua aplicação. A transparência e a opacidade do polímero é consequência da morfologia, ou estrutura química relacionada à massa molecular do material. Filmes obtidos a partir de proteínas de soro de leite caracterizam-se pela transparência, flexibilidade, ausência de odor e sabor, favorecendo sua aceitabilidade para consumo (Chen, 1995).

A temperatura e umidade relativa são variáveis importantes na aplicação de filmes protéicos, pois a barreira a vapor d'água e gases depende da umidade relativa do ambiente de estocagem, onde altos valores tornam os filmes hidrofílicos, incorporando água em sua estrutura e aumentando a permeabilidade. E o aumento da temperatura provoca uma maior taxa de respiração (Baldwin et al., 1995).

A aplicação de filmes e coberturas em frutas e vegetais frescos ou minimamente processados reduz o amadurecimento, o escurecimento, a mudança de cor, a perda de aroma, umidade e textura, pois promove uma barreira a gases, vapor d'água, diminuindo as taxas de metabolismo e oxidação (Li & Barth, 1998). Cobertura de alginato foi aplicada em cebolas, reduzindo a perda de água e aumentou o tempo de armazenamento (Hershko & Nussinovitch, 1998); o mesmo resultado foi obtido em amostras de alho cobertas com filmes de alginato, gelana e carragena (Nussinovitch & Hershko, 1996).

A integridade fibrosa das frutas é facilmente alterada durante o processamento tomando os produtos prontos para comer mais perecíveis do que o produto original. Assim frutas frescas cortadas são mais difíceis de processar, e sua vida-de-prateleira depende de fatores como tipo de cultivo, estágio de amadurecimento no corte, condições de estocagem (atmosfera e temperatura) (Role & Chism III, 1987). Ao cortar um fruto, provoca-se uma descompartimentação celular das enzimas e seus substratos, conduzindo a deteriorações bioquímicas, como o escurecimento enzimático, quebra de textura e perda de aromas (Varoquax et al., 1991, Haard, 1998).

Maçã descascada é um produto perecível que deve ser preservado contra o escurecimento enzimático e desenvolvimento microbiano. Em amostras de maçãs pré-descascadas, geralmente utilizam-se preservativos químicos, embalagem a vácuo e refrigeração durante a distribuição para evitar a perda de qualidade. Os sulfitos são os preservativos mais eficazes, mas seu uso é controlado por legislação e tem sido rejeitado em frutas e vegetais, estimulando outras alternativas para inibir o escurecimento (Son et al., 2001; Soliva-Fortuny et al., 2001; Baldwin et al., 1996; McHugh & Senesi, 2000).

A mudança de cor em maçãs e batatas cortadas ocorre principalmente pelo escurecimento enzimático através da enzima polifenoxidase em pH ótimo de 5,0-7,0. Reações de escurecimento estão relacionadas com a oxidação de compostos fenólicos formando o-quinonas, da qual resulta em pigmento marrom (Sapers, 1993). Baldwin et al. (1996) aplicaram cobertura a base de celulose em pedaços de batatas e maçã em pedaços, aumentando em uma semana a vida de prateleira, acondicionadas a 4°C.

O escurecimento e a perda de água em maçã fatiada foram impedidos através do uso de cobertura a base de quitosana e ácido láurico (Pennisi, 1992). Baldwin et al. (1995) aplicaram cobertura a base de caseína e lipídios (cera de abelha, monoglicerídeo acetilado e estearato) em maçãs minimamente processadas, aumentando o tempo de estocagem ao avaliar a perda de umidade e o escurecimento oxidativo. Coberturas a base de polissacarídeos e lipídios também reduziram a respiração em fatias de maçã (Wong et al., 1994). O critério de qualidade da eficiência de cobertura e filmes em frutas deve ser determinado cuidadosamente, evidenciando parâmetros como mudança de cor, textura, perda de peso, que devem ser controlados durante o período de estocagem (Park, 1999).

Diversas aplicações de filmes e coberturas biodegradáveis tem sido estudadas como alternativa para prolongar o tempo de armazenamento de produtos frescos e minimamente processados, tais como, emulsão de caseinato e ácido esteárico em cenouras descascadas (Avena-Bustillos & Krochta, 1993), coberturas de celulose em batatas e maçãs descascadas (Baldwin et al., 1996); coberturas de celulose e óleo mineral em pimenta verde (Lerdthanangkul & Krochta, 1996), coberturas de cera de carnaúba e celulose em manga (Baldwin et al., 1999); coberturas de proteínas de soro de leite em amendoim (Maté & Krochta, 1996b).

A aplicação de coberturas a base de celulose em fatias de cenoura retardou a ação da enzima que provoca o esbranquiçamento, e a perda de umidade em amostras com cobertura não foi significativa, favorecendo o prolongamento da vida-de-prateleira. Após o descascamento, a cenoura fica suscetível a mudanças fisiológicas, como a oxidação do caroteno e o aumento da taxa de respiração, que limitam o período de armazenamento, pois resultam na degradação de proteínas, carboidratos e lipídios (Li & Barth, 1998). Segundo Bolin & Huxsoll (1991), a retirada da casca provoca o surgimento de uma nova camada superficial, caracterizada por um esbranquiçamento, resultado da desidratação e lignificação (reação enzimática) da superfície da cenoura. Coberturas a base de caseinato de sódio e ácido esteárico reduziram o esbranquiçamento em cenouras descascadas (Howard & Dewi, 1995).

2.10 – Digestibilidade de Filmes Protéicos

Proteínas do leite geralmente são digeridas inicialmente no estômago através da ação da enzima pepsina e, a hidrólise é finalizada no intestino, onde são absorvidas através das paredes intestinais (Kitabatake & Kinekawa, 1998). O valor nutricional das proteínas pode ser obtido através de avaliação biológica experimental, e para isto métodos *in vitro* oferecem a vantagem de produzir resultados em um tempo menor do que procedimentos de análise por ingestão. Assim, métodos *in vitro* são eficazes na determinação do valor nutricional de proteínas (Villegas et al., 1968; Akenson & Stahmann, 1964).

LeTien et al. (2000) avaliaram a estabilidade dos filmes a base de concentrado protéico de soro de leite à proteólise utilizando a enzima tripsina, e a biodegradabilidade através da enzima pancreatina, concluindo que estes filmes contêm compostos como lipídios que podem retardar o acesso do sítio proteolítico, reduzindo a atividade catalítica das enzimas. Villegas et al. (1968) estudaram a digestibilidade de caseínas e albuminas utilizando pepsina e pancreatina, sendo expressa como a quantidade de nitrogênio solúvel comparada ao teor de nitrogênio total da amostra.

Alguns fatores tendem a limitar a digestibilidade e reduzir a qualidade nutricional das proteínas, como a estrutura, a formação de complexo com amido, a presença de polifenóis (termoestáveis) que formam um complexo com as proteínas e, estas perdem a capacidade de hidrólise (Nielsen, 1995).

A digestibilidade de filmes protéicos modificados enzimaticamente com a enzima transglutaminase foi estudada, indicando alta digestibilidade, tais como filmes de caseinato que foram hidrolisados pela tripsina (Lorenzen et al., 1998); filmes de proteína do soro de leite que foram digeridos com enzimas proteolíticas (Yildirim & Hettiarachchy, 1998; Mahmoud & Savello, 1992), e o mesmo em filmes de α_{S1} -caseína (Motoki et al., 1987).

CAPÍTULO 3

3 – Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

Os filmes foram obtidos a partir de concentrado protéico de soro de leite comercial, com 80% de proteína, fornecido pela indústria CALPRO Ingredients (Califórnia, USA).

Os demais constituintes do filme são:

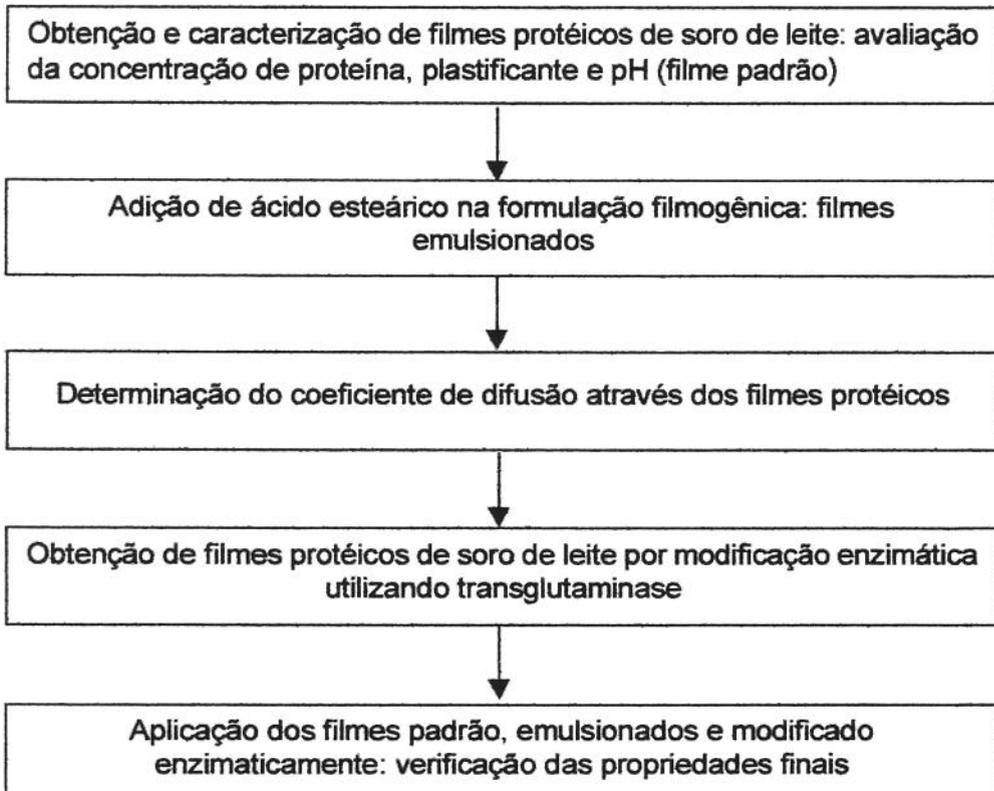
- * plastificante: glicerol (MERCK)
- * ácido esteárico (Riedel-de-Haën)
- * antiespumante (Sigma)
- * Enzima Transglutaminase (EC 2.3.2.13), não dependente de cálcio e produzida por fermentação através de microrganismos. Produto ACTIVA TG-MP fornecido pela AJINOMOTO Interamericana Ind. e Com. Ltda. As características da enzima fornecidas pela empresa são:
 - pH ótimo: 6,0-7,0
 - T ótima: 50°C
- * α -lactalbumina e β -lactoglobulina purificadas, liofilizadas, fornecidas por Besnier Bridel Alimentaire (França)
- * Lactose PA (Synth) e dextrina branca (Vetec)

As enzimas utilizadas na digestibilidade foram pepsina (Sigma) e pancreatina (Sigma).

Os sais e substâncias utilizados para obtenção das soluções saturadas no procedimento das isotermas de sorção foram: água destilada, cloreto de lítio (LiCl); cloreto de magnésio (MgCl₂); carbonato de potássio (K₂CO₃); nitrato de magnésio (MgNO₃); brometo de sódio (NaBr); cloreto de sódio (NaCl); cloreto de potássio (KCl); cloreto de bário (BaCl₂).

3.2 - Métodos

3.2.1 – Fluxograma geral das etapas desenvolvidas



3.2.2 – Caracterização da matéria-prima

O concentrado protéico de soro de leite foi caracterizado quanto ao teor de proteína, umidade, gordura e cinzas:

- Teor de proteína - a porcentagem de nitrogênio total foi determinada através do Método de Kjeldahl (nº 99120, AOAC, 1997), utilizando o fator de 6,38.
- Gordura - a gordura foi determinada por diferença de peso depois de extraída com éter etílico e éter de petróleo e seca em estufa a 60°C (Método de Mojonnier, nº 98905), segundo AOAC (1997).
- Cinzas - (matéria inorgânica): determinada através da perda de peso após incineração do produto em uma mufla, a 525°C, com destruição da matéria orgânica, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (método nº 94546, AOAC, 1997).
- Teor de umidade - determinada por diferença de peso após secagem das amostras em estufa a 110°C por 12 horas, segundo AOAC (nº 92705, 1997).

3.2.3 - Formação dos filmes

A metodologia para a obtenção dos filmes comestíveis consistiu, primeiramente, na dispersão da proteína (concentração de proteína, Cp) em água destilada, seguida de uma homogeneização até a solubilidade total do concentrado protéico de soro de leite. Adicionou-se o plastificante (concentração de glicerol, Cg) e a solução filmogênica foi aquecida à temperatura de 90°C por 30 minutos em banho-maria, com o objetivo de desnaturar a proteína. A solução foi resfriada em banho de gelo, sob agitação branda até atingir temperatura ambiente. O pH da solução foi ajustado, utilizando-se NaOH 0,1N ou ácido acético 0,1N. A solução filmogênica foi dispersa em um suporte acrílico com dimensões de 15cm X 15cm e em placas de Petri de plástico com diâmetro de 9cm. O controle de espessura foi efetuado através do volume aplicado no suporte. A etapa seguinte correspondeu à evaporação do solvente, através do processo de secagem nas condições de temperatura ambiente (aproximadamente entre 25°-30°C), durante a noite, garantindo uma secagem lenta dos filmes.

3.2.4 - Avaliação das características dos filmes

- **Espessura** – as medidas de espessura dos filmes foram efetuadas utilizando um micrômetro com sensibilidade de 0,001 mm (Modelo nº 293, Mitutoyo, Japan). A espessura média (mm) foi determinada a partir de 5 medidas aleatórias.
- **Aspecto Visual** – caracterização visual e tátil. Os filmes foram avaliados quanto às seguintes características:
 - Homogeneidade: avaliação quanto à presença de partículas insolúveis visíveis, zonas de opacidade, cores heterogêneas. A espessura, estrutura, cor e transparência que devem apresentar uniformidade
 - Continuidade: presença de fraturas ou rupturas
 - Manuseio: a facilidade em retirar os filmes do suporte e a sua elasticidade
- **Cor** – a cor final dos filmes foi medida através de um colorímetro (Colorquest II, Hunter Associates Laboratory Inc, Virginia) avaliando os valores do índice de luminosidade L*, índices de croma a* e b* e a opacidade.

3.2.5 - Análises físico-químicas

- **Proteínas**: Método Kjeldahl (AOAC, 1996): as proteínas foram determinadas pela quantidade de nitrogênio total da amostra. O fator de conversão utilizado no cálculo do teor de proteína bruta foi de 6,38.
- **Teor de Umidade** (Mahmoud & Savello, 1992): o teor de umidade dos filmes foi medido através da porcentagem da perda de peso após a secagem em uma estufa à temperatura de 110°C por 24 horas.

3.2.6 - Solubilidade protéica

Em um tubo de ensaio adicionou-se uma quantidade de filme conhecida, correspondente à 0,1g de proteína, em tampão McIlvaine (pH 7,0), em seguida foi agitada em um Vórtex por 1 minuto, e deixada em repouso por 48 horas, novamente agitou-se em

Vórtex por 1 minuto. A solução foi filtrada e a quantidade de proteína solubilizada no sobrenadante foi determinada através do Método de Kjeldahl (AOAC, 1996).

3.2.7 - Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada baseando-se no método padronizado ASTM E96-95 (1995a), que corresponde à técnica gravimétrica, onde os filmes foram fixados na parte superior de uma célula ou recipiente que contém um dessecante (sílica). Este sistema foi acondicionado em uma câmara com temperatura e umidade relativa controladas (através de uma solução de NaCl saturada, com umidade relativa correspondente a 75%). A medida do peso final do sistema foi feita após 5 dias de incubação do sistema, e então, determinou-se o valor da massa (M_p) de umidade adsorvida pela sílica, correspondente à diferença entre a massa final e inicial do sistema. A permeabilidade ao vapor d'água foi obtida através da equação

$$\text{Permeabilidade} = \frac{M_p \times \text{espessura}}{A \times \text{tempo} \times \Delta p}$$

onde, M_p corresponde à massa de umidade adsorvida (g); A é a área da superfície exposta do filme (m^2); Δp é a diferença de pressão parcial através do filme. A determinação foi feita utilizando 5 amostras de cada ensaio.

3.2.8 - Tensão na ruptura e porcentagem de alongação

A determinação da tensão na ruptura e porcentagem de alongação foi feita, baseando-se no método padronizado ASTM D882 (ASTM, 1995b). As amostras foram cortadas (25,4 x 100,0 mm) e acondicionadas em câmaras com temperatura (25°C) e umidade relativa (75%) controladas, num período de 48 horas. Em seguida, a tensão na ruptura e a porcentagem de alongação foram medidas utilizando o texturômetro TATX2. A tensão na ruptura foi calculada dividindo a força pela área de secção transversal e a porcentagem de alongação, dividindo-se a distância obtida pela distância inicial do probe (50mm) e multiplicando-se por 100. A determinação foi feita utilizando 10 amostras de cada ensaio.

3.3 - Planejamento Experimental

Foi utilizado um planejamento experimental fatorial de dois níveis, o que corresponde à seleção de 2 níveis para cada variável de entrada, sendo que as variáveis independentes são: concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg) e pH (Neto et al., 2001). A execução do planejamento consistiu em realizar ensaios em todas as possíveis combinações destes níveis e registrar as respostas observadas. A listagem destas combinações representa a matriz de planejamento experimental, apresentada na Tabela 3

Tabela 3: Matriz de planejamento 2^3 +pontos axiais.

Ensaio	Cp	Cg	pH
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,68	0	0
13	+1,68	0	0
14	0	-1,68	0
15	0	+1,68	0
16	0	0	-1,68
17	0	0	+1,68

A matriz representa um planejamento experimental fatorial de 2 níveis e 3 variáveis independentes (2^3), com mais $2n$ experimentos, possibilitando a avaliação do ajuste do modelo de 1ª e 2ª ordem. A matriz constou de 17 ensaios, onde 8 correspondem ao planejamento fatorial completo, 3 são repetições do ponto central e 6 correspondem aos pontos axiais.

Neste planejamento, os pontos axiais corresponderam a uma ampliação da faixa de estudo, caracterizados por pontos distantes geometricamente de $1,68$ (α_p) do ponto central. Este valor foi obtido através da equação (Khuri & Cornell, 1987):

$$\alpha_p = (2^n)^{1/4} \quad (\text{Eq. 21})$$

onde, n é o número de variáveis independentes. As faixas de operação do planejamento experimental estão apresentadas na Tabela 4 e foram estipuladas a partir de ensaios preliminares, determinando as concentrações limites de formação dos filmes protéicos de soro de leite, que apresentassem condições mínimas de manuseio possibilitando a avaliação de suas características.

Tabela 4: Tabela de valores codificados e decodificados referentes ao planejamento fatorial 2^3 +pontos axiais.

Variáveis	$-\alpha_p$	-1	0	+1	$+\alpha_p$
Cp (%)	4,82%	5,50%	6,50%	7,50%	8,18%
Cg (%)	1,82%	2,50%	3,50%	4,50%	5,18%
pH	5,20	5,90	6,90	7,90	8,60

Para uma melhor visualização, as condições das variáveis independentes para cada ensaio estão apresentadas em forma de matriz de planejamento na Tabela 5. As respostas de avaliação dos filmes formados foram solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação segundo procedimentos descritos nos itens 3.2.2 a 3.2.8.

Tabela 5: Matriz das condições do planejamento fatorial 2^3 +pontos axiais.

Ensaio	Cp	Cg	pH
1	5,50	2,50	5,90
2	7,50	2,50	5,90
3	5,50	4,50	5,90
4	7,50	4,50	5,90
5	5,50	2,50	7,90
6	7,50	2,50	7,90
7	5,50	4,50	7,90
8	7,50	4,50	7,90
9	6,50	3,50	6,90
10	6,50	3,50	6,90
11	6,50	3,50	6,90
12	4,82	3,50	6,90
13	8,18	3,50	6,90
14	6,50	1,82	6,90
15	6,50	5,18	6,90
16	6,50	3,50	5,20
17	6,50	3,50	8,60

3.4 - Isotermas de Sorção

Filmes protéicos a base de soro de leite foram obtidos com a seguinte formulação: 6,50% de proteína, 3,00% de plastificante (glicerol) e pH 7,0. O procedimento para a obtenção dos filmes foi o mesmo descrito no item 3.2.3.

Os filmes foram cortados em quadrados (0,50 cm de lado) e pré-acondicionados em dessecador contendo sílica, por 7 dias. As amostras foram distribuídas em placas, e estas em 10 potes contendo soluções salinas saturadas, com diferentes umidades relativas, pesando em média 1 a 2 g (por placa). Os potes foram acondicionados em incubadora BOD (TECNAL, Mod. TE-390), nas temperaturas de 10°, 25° e 35°C. Inicialmente, foram feitas pesagens diárias das placas contendo as amostras, em balança analítica, para verificar o tempo para atingir massa constante para cada temperatura trabalhada. Uma vez atingido, determinou-se o teor de umidade das amostras em estufa (110°C por 24 horas). O experimento foi repetido, em triplicata, deixando as amostras

acionadas nos potes durante o tempo de equilíbrio determinado para cada temperatura. O teor de umidade foi considerado como a média de triplicatas.

As isotermas de sorção foram ajustadas utilizando as equações de GAB e BET, utilizando o programa computacional Statistica version 5.0. E avaliação do ajuste foi baseada em valores do coeficiente de correlação (R) e porcentagem de confiança (P), calculados pelo programa estatístico. Outro parâmetro utilizado para a verificação da qualidade do ajuste foi o módulo de desvio relativo médio, erro (E%) expresso através da equação (Lomauro et al., 1985)

$$E = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{X_i - X_{pi}}{X_i} \right| \quad (\text{Eq.22})$$

A seleção das soluções salinas utilizadas foi baseada em estudos anteriores de determinação de isotermas de sorção em alimentos, visando abranger o maior intervalo de atividade de água. Os valores de atividade de água (a_w) das soluções salinas saturadas, nas temperaturas de 10°, 25° e 35°C estão apresentadas na Tabela 6. Os filmes protéicos a base de soro de leite, nesta formulação trabalhada, foram previamente caracterizados quanto a porcentagem de proteína, teor de umidade, espessura média, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura, porcentagem de alongação e solubilidade protéica. Os procedimentos estão descritos nos itens anteriores.

Tabela 6: Variação da atividade de água de equilíbrio com a temperatura.

Sais	atividade de água (a_w)		
	T= 10°C	T= 25°C	T= 35°C
LiCl	0,1284	0,1105	0,1087
MgCl ₂	0,3352	0,3300	0,3200
K ₂ CO ₃	0,4549	0,4430	0,4317
MgNO ₃	0,5720	0,5286	0,5157
NaBr	0,6215	0,5770	0,5455
NaCl	0,7565	0,7528	0,7511
KCl	0,8638	0,8426	0,8295
BaCl ₂	0,9153	0,9019	0,8940

Fonte: Greenspan, 1977; Noreña et al., 1996; Gontard, 1991; Labuza et al., 1985.

3.5 - Obtenção de Filmes Multicomponentes

3.5.1 - Formação do filme emulsionado

A metodologia consistiu, primeiramente, na dispersão da proteína em água destilada, seguida de uma homogeneização até solubilização completa do concentrado protéico de soro de leite (6,50% de proteína). Adicionou-se o plastificante (3,00% de glicerol) e a solução filmogênica foi aquecida à temperatura de 90°C por 30 minutos em banho-maria. Imediatamente foi adicionado o ácido graxo (0,00; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00%) e antiespumante. A solução foi homogeneizada em agitador mecânico, à velocidade de 4700rpm (Fisatom, Mod. 713D) por 10 minutos, utilizando haste do tipo hélice, sob aquecimento por uma chapa quente (Hotlab II, Nalgon) (a temperatura da solução deve estar próxima ao ponto de fusão do ácido graxo). Resfriou-se a solução em banho de gelo até temperatura ambiente. As bolhas de ar foram retiradas utilizando bomba de vácuo. O pH da solução foi ajustado, utilizando-se NaOH 0,1N ou ácido acético 0,1N. A solução filmogênica foi dispersa em placas de Petri de plástico com diâmetro de 9 cm e 14 cm. O controle de espessura foi efetuado através do volume aplicado no suporte.

3.5.2 - Caracterização e avaliação das propriedades mecânicas

Os filmes emulsionados foram caracterizados quanto ao teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura, porcentagem de alongação, assim como as características visuais e táteis. As determinações seguem os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.2.2 a 3.2.8.

3.6 - Difusão em Filmes Protéicos a Base de Soro de Leite

A adsorção de umidade pelos filmes protéicos a base de soro de leite foi determinada em três posições distintas: horizontal com a face do filme voltada para cima e voltada para baixo e na vertical. A formulação do filme consistiu em 6,5% de proteína,

73,0% glicerol e pH 7,0, e a solução filmogênica foi aplicada em placas de acrílico de 13,5 x 3,5 cm. O procedimento de obtenção dos filmes é a mesmo descrito no item 3.2.3.

Os filmes foram acondicionados em dessecadores a 75% de umidade relativa e 25°C, e foi determinado o ganho de massa até atingir peso constante. É importante ressaltar que os filmes trabalhados na posição horizontal apresentavam-se completamente aderidos à superfície acrílica, não apresentando nenhuma bolha de ar na interface filme-placa. O teor de umidade dos filmes foi determinado no início e final do experimento. Medidas de espessura foram feitas antes de iniciar o experimento, utilizando um micrômetro (Modelo nº 293, Mitutoyo, Japan), em 13 posições aleatórias. Outra formulação foi estudada, adicionando-se 1,0% de ácido esteárico. O procedimento de obtenção dos filmes emulsionados foi o mesmo descrito no item 3.5.1.

3.7 – Obtenção de Filmes Protéicos por Modificação Enzimática Utilizando Transglutaminase

Para uma melhor atuação da enzima, optou-se por trabalhar nas condições ótimas de atividade, fornecidas pela Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda., ou seja, em uma temperatura de 50°C e pH 7,0. O procedimento consistiu no preparo da solução aquosa contendo 6,50% de proteína do soro de leite e 3,0% de plastificante (glicerol). Paralelamente, o produto (ACTIVA TG-MP) contendo a enzima foi solubilizado em água destilada, na concentração pré-determinada, expressa em unidades de transglutaminase por grama de proteína (U/g proteína). As duas soluções foram misturadas e ajustou-se o pH 7,0 com NaOH 0,1N e ácido acético 0,1N. A incubação foi feita na temperatura de 50°C, em banho-maria com agitação (Banho Dubnoff Mod. TE-053, Tecnal), por um tempo pré-determinado. Em seguida a enzima foi inativada através da imersão da solução filmogênica em banho-maria na temperatura de 85°C, por 10 minutos, garantindo-se que a solução atingisse a temperatura interna de 80°C, e permanecesse nela durante 1 minuto. A solução foi resfriada em banho de água gelada até temperatura ambiente. Retirou-se uma alíquota para o procedimento de exclusão molecular e o restante foi aplicado em suportes planos (placa de acrílico, com dimensão de 15x15cm e placas de Petri com diâmetro de 9cm). A secagem foi feita em condições ambiente (aproximadamente 25°-30°C) durante a noite.

3.7.1 - Exclusão molecular

O procedimento de exclusão molecular foi realizado no HPLC (High performance liquid chromatography) Varian, onde foram injetados 20 µl de solução na coluna RES ELUT-SEC 3000 steel (300 X 7,75 mm) Varian, sob fluxo de solvente a 1 ml/min, com fase móvel de tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) e temperatura ambiente. O detector utilizado foi absorvância à 280nm (Motoki & Nio, 1983). Os padrões utilizados foram as proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina, BSA (albumina de soro bovino) e o concentrado protéico de soro de leite. As amostras foram diluídas na proporção de 0,06% de proteína.

3.7.2 - Eletroforese

O sistema SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio poliacrilamida gel) foi utilizado baseado em Laemmli (1970). Utilizou-se um gel de resolução com 12% de acrilamida, feito em sistema Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories Ltda.) e gel de empacotamento com 4% acrilamida. As amostras de filmes foram dissolvidas em tampão redutor com SDS, na presença de β -mercaptoetanol (62,5mM Tris-HCl, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8) e aquecidos a 95°C por 5 minutos. Aplicaram-se 5µl de amostra por canaleta. A voltagem foi mantida constante em 120 V durante a corrida em tampão SDS-tris-glicina. Os géis foram corados com 0,1% de Comassie Brilhante Blue G-250, 15% sulfato de amônia, 2% de ácido fosfórico (Brilliant Blue-G colloidal, SIGMA) e descorados com água destilada. O padrão de peso molecular continha as seguintes proteínas: fosforilase b (97000 Da), albumina (66000 Da), ovalbumina (45000 Da), anidrase carbônica (30000 Da), inibidor tripsina (20100 Da) e α -lactalbumina (14400 Da) (Amershan Pharmacia Biotech Ltda.).

3.7.3 - Caracterização do filme

Os filmes tratados com a transglutaminase foram caracterizados quanto ao teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão

na ruptura, alongação as características visuais e táteis. As determinações seguem os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.2.2 a 3.2.8.

3.8 - Aplicação dos Filmes Protéicos a Base de Soro de Leite

Maçãs de origem Argentina foram adquiridas no mercado local, lavadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio, secas e cortadas na forma de cilindros de dimensões de 4,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura. A escolha das maçãs foi feita a partir de análises visuais, selecionando amostras com tamanhos similares e descartando as que apresentavam pequenos defeitos.

Os sistemas de embalagem eram compostos por potes plásticos, contendo pedaços de maçã, fechados com filmes protéicos de soro de leite. Os tipos de tratamentos aplicados foram em sistema aberto, ou seja, sem filme; e sistemas fechados, ou seja, tampados com os filmes, com e sem a injeção de gás nitrogênio. Após o corte, as maçãs foram imediatamente colocadas nos potes plásticos, que foram fechados com os filmes protéicos de soro de leite, utilizando cola de silicone; este tratamento foi denominado sistema fechado com ar ambiente. Em embalagens com atmosfera modificada, após o fechamento, gás nitrogênio analítico era injetado em tempo pré-determinado, visando expulsar todo o ar ambiente de dentro dos potes plásticos. A condição controle foi estipulada como cilindros de maçã em potes sem o fechamento (sistema aberto). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

As embalagens foram armazenadas em duas condições, na temperatura de 25°C e 75% de umidade relativa e em 10°C, em incubadoras BOD (TECNAL, Mod. TE-390). O estudo das propriedades de barreira ao vapor d'água dos filmes foi realizado através da perda de peso, da redução da textura e diminuição do teor de umidade das amostras de maçã, em intervalos de tempo pré-definidos. A perda de peso foi feita através de pesagens periódicas dos sistemas de embalagem em balança analítica. A textura foi medida utilizando um texturômetro TATX2, avaliando a força necessária para perfurar os pedaços de maçã, utilizando um probe de 2,0mm de diâmetro, na velocidade de 1mm/s. E o teor de umidade final dos pedaços de maçã foi determinado por diferença de peso em estufa por 24 horas a 60°C, seguido por 12 horas a 105°C. A permeabilidade a gases foi verificada através da mudança de cor nas amostras de maçã, medida através de um

colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Hunter Associates Laboratory Inc, Virginia), avaliando os valores do índice de luminosidade L^* , dos índices de croma a^* e b^* . Filmes padrão, obtidos por desnaturação térmica; filmes emulsionados, contendo 0,50% de ácido esteárico e filmes modificados enzimaticamente com transglutaminase (10U/g proteína e incubados a 180 minutos a 50°C) foram aplicados nos sistemas de embalagem e os resultados foram comparados para verificar a eficácia como embalagens em alimentos.

3.9 - Digestibilidade dos Filmes Protéicos a Base de Soro de Leite

A digestibilidade *in vitro* foi determinada de acordo com Akeson & Stahmann (1964). As amostras de filme contendo 0,1g de proteína foram pesadas e hidrolisadas com a enzima pepsina em solução de HCl 0,1N, por 4 horas a 37°C, em banho-maria sob agitação lenta. Ajustou-se o pH para 7,0, e, então as amostras foram hidrolisadas com a enzima pancreatina em solução de tampão fosfato pH 8,0, por 24 horas a 37°C e, em banho-maria sob agitação lenta. Em seguida, as proteínas não hidrolisadas foram precipitadas com TCA (ácido tricloroacético), a solução foi centrifugada por 15 minutos a 5000rpm e filtrada em papel de filtro Millipore nº 2. O teor de nitrogênio solúvel na solução sobrenadante foi determinada pelo Método de Kjeldahl (AOAC, 1996).

3.10 – Análises Estatísticas

A análise estatística dos resultados foi efetuada através do teste de Tukey com diferença significativa de $p \leq 0,05$, utilizando o programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). E o planejamento experimental fatorial foi analisado através do programa computacional Statistica version 5.0.

CAPÍTULO 4

4 - Influência da Concentração de Proteína, Plastificante e pH na Formação de Filmes Protéicos de Soro de Leite

4.1 - Planejamento Experimental

A composição química do concentrado protéico de soro de leite (CALPRO 8002) foi determinada, inicialmente, correspondendo a $77,46 \pm 0,51\%$ de proteína, $5,50 \pm 0,12\%$ de cinzas, $5,52 \pm 0,16\%$ de gordura, $6,91 \pm 0,28\%$ de umidade.

Os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual e tátil, ou seja, a presença de partículas insolúveis, cor, presença de poros, transparência, presença de fraturas/rupturas e fragilidade. A aparência é um fator importante para aplicação como embalagem em produtos alimentícios, pois dependendo das condições de armazenamento, deve apresentar um bom manuseio, ser transparente, não exalar odor, garantindo a aceitação do consumidor. Os filmes protéicos de soro de leite apresentaram-se todos transparentes, com coloração amarela clara e, em algumas formulações, fragilidade alta, dificultando o manuseio, tais como os de baixa concentração de plastificante e proteína e baixos valores de pH. Pontos críticos foram observados, no que se refere à presença de poros, em baixos valores de pH; de partículas insolúveis, em baixos valores de pH e alta C_p (concentração de proteína), associado à ampla faixa estudada para as variáveis independentes, sendo de grande importância na escolha de uma formulação otimizada (melhor formulação), ou seja, apesar de apresentarem

respostas indesejáveis, o planejamento experimental visou estudar o efeito das variáveis nas respostas, indicando a tendência de sua influência na formação e em características finais dos filmes.

A medida de espessura dos filmes foi feita antes de todos os experimentos, em 5 posições aleatórias, e seu controle foi feito pelo volume de solução aplicado, observando que quanto mais viscosa a solução filmogênica, mais espesso o filme, por exemplo, soluções com alta concentração de proteína e com baixo pH.

4.1.1 – Análises estatísticas

A partir de ensaios preliminares, observou-se que a concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg) e o pH da solução filmogênica eram variáveis importantes na formação de filmes de proteínas do soro de leite. O conhecimento dos efeitos provocados nas características mecânicas e de barreira nos filmes apresenta fundamental importância. Assim, optou-se pela utilização de um planejamento experimental (fatorial completo) para avaliar e quantificar a influência destas variáveis, e também foram feitas análises de superfície de respostas, possibilitando determinar a melhor formulação para o estudo de filmes protéicos a base de soro de leite.

O planejamento experimental tem grande importância em pesquisas preliminares, ou seja, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta, sem se preocupar ainda com uma descrição rigorosa desta influência (Neto et al., 2001). As respostas de avaliação dos filmes foram: solubilidade protéica; permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação. A análise destas permitiu estudar o efeito das variáveis Cp, Cg e pH na formação de filmes de soro de leite bovino. A determinação dos pontos axiais (-1,68 e +1,68) para as variáveis independentes foi obtida a partir de ensaios prévios, buscando os valores mínimo e máximo, ou seja, as concentrações limite para formar filmes protéicos de soro de leite.

A Tabela 7 apresenta o resultado da análise das respostas estudadas (solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação) do planejamento experimental, assim como os níveis das variáveis independentes (Cp, Cg e pH), o teor de umidade (X) e teor de proteína dos filmes protéicos de soro de leite.

Apesar dos filmes terem sido armazenados sob as mesmas condições, os valores de umidade dos filmes não se mostraram uniformes, relacionado às diferentes formulações trabalhadas. O teor de umidade é maior quando se trabalha em pH básico (pH 7,90), onde a presença de um maior número de moléculas carregadas promove uma maior capacidade de absorver água, aumentando a umidade dos filmes (Anker et al., 1999). E a concentração de plastificante apresentou relação direta com o teor de umidade dos filmes protéicos, observando que formulações filmogênicas com maior concentração de glicerol, formaram filmes com maior teor de umidade, associado a característica hidrofílica deste plastificante. A espessura média determinada para os filmes foi de $0,081 \pm 0,008$ mm.

É importante ressaltar que as respostas obtidas através do planejamento, ou seja, a determinação de uma melhor formulação envolvendo concentração de proteína, concentração de plastificante e pH, foi específica para este estudo de filmes protéicos de soro de leite, nos intervalos (ou faixas) estipulados e para as características de barreira e mecânica esperadas.

Nos itens abaixo, a análise estatística foi efetuada para cada resposta (solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação), verificando o efeito de cada variável independente (concentração de proteína, concentração de plastificante e pH), a avaliação de um modelo preditivo através do ajuste por mínimos quadrados, a análise das superfícies de resposta, que permitiram determinar uma melhor formulação para a obtenção de filmes protéicos de soro de leite através do processo de desnaturação térmica (aquecimento da solução protéica a 90°C), denominada como formulação padrão.

Tabela 7: Solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos obtidos a partir do planejamento experimental, sendo as variáveis independentes: concentração de proteína (%Cp), concentração de plastificante (%Cg) e pH.

Ensaio	Variáveis Independentes				Variáveis Dependentes				Teor de proteína (%) ¹
	Cp (%)	Cg (%)	pH	Solubilidade protéica (%)	Permeabilidade Vapor d'água (gmm/hm ² kPa)	Tensão na ruptura (MPa)	Alongação (%)	X (%)	
1	5,50	2,50	5,90	0,3401	0,1576	4,4686	7,21	17,50	64,77
2	7,50	2,50	5,90	0,2639	0,3397	4,8969	14,04	14,85	66,76
3	5,50	4,50	5,90	0,4374	0,1997	2,9556	17,14	16,16	52,04
4	7,50	4,50	5,90	0,3329	0,3102	3,2143	17,54	18,27	58,45
5	5,50	2,50	7,90	0,3031	0,1755	3,8741	14,64	11,51	62,98
6	7,50	2,50	7,90	0,2391	0,1966	4,7771	41,01	10,48	64,49
7	5,50	4,50	7,90	0,4177	0,2025	3,5603	59,04	20,96	55,38
8	7,50	4,50	7,90	0,2605	0,2729	3,7675	48,99	17,00	57,78
9	6,50	3,50	6,90	0,3105	0,2468	4,8767	20,87	12,69	61,73
10	6,50	3,50	6,90	0,3250	0,2597	4,9144	18,97	12,19	61,00
11	6,50	3,50	6,90	0,3197	0,2462	4,9538	20,10	13,55	62,02
12	4,82	3,50	6,90	0,3395	0,2201	4,4593	29,51	18,82	62,73
13	8,12	3,50	6,90	0,2422	0,2785	5,0662	56,01	11,39	69,73
14	6,50	1,82	6,90	0,2919	0,2662	6,7244	18,08	9,45	66,66
15	6,50	5,18	6,90	0,3117	0,2842	3,3840	55,25	16,46	60,08
16	6,50	3,50	5,20	0,3416	0,4316	3,1597	15,23	15,10	60,18
17	6,50	3,50	8,60	0,2552	0,2406	3,9977	63,61	13,83	61,86

1- em 0,1g de filme

4.1.2 – Solubilidade protéica

A solubilidade protéica representa a quantidade de proteína que migra para a solução ou em uma dispersão coloidal sob condições específicas e não sedimenta sob forças centrífugas moderadas (Kinsella, 1984). É considerada uma propriedade importante na aplicação de filmes comestíveis como proteção de alimentos com alta atividade de água ou quando os filmes devem estar em contato com a água durante o processamento de cobertura do alimento (Gontard *et al.*, 1992; Pérez-Gago & Krochta, 2001).

Os resultados de solubilidade protéica dos filmes de soro de leite podem ser avaliados na Tabela 7. Todos os filmes mantiveram a integridade após 48 horas de incubação em tampão aquoso, podendo associar a monômeros protéicos, pequenos peptídios e material não protéico que não participaram da formação da matriz polimérica protéica, uma vez que esta permaneceu intacta, indicando a formação de uma rede com alta estabilidade. A desnaturação térmica aplicada nas soluções filmogênicas promoveu a exposição dos grupos sulfidrílicos (SH), favorecendo a formação de ligações covalentes dissulfídicas entre as cadeias de proteínas, reduzindo a solubilidade protéica.

O mesmo resultado foi obtido por Yildirim & Hettiarachchy (1998) com filmes de proteína do soro de leite modificado enzimaticamente e, através da eletroforese, verificou-se que somente uma pequena quantidade de proteína permaneceu sob a forma monomérica, indicando que a solubilidade protéica dos filmes correspondeu a monômeros de proteínas que não participaram na formação da matriz filmogênica. Mahmoud & Savello (1993) chegaram à mesma conclusão com filmes a base de α -lactalbumina e β -lactoglobulina; para os filmes de para α_{s1} -caseína por Motoki *et al.* (1987); filmes de proteína do soro de leite por Galietta *et al.* (1998) e Pérez-Gago & Krochta (1999). Cuq *et al.* (1998) associaram a baixa solubilidade de filmes a base de proteína às ligações covalentes dissulfídicas que estabilizam a matriz filmogênica.

O tempo de incubação dos filmes em solução tampão aquosa foi estipulado em 48 horas após estudo prévio, avaliando a solubilidade protéica máxima em função do tempo de imersão dos filmes protéicos de soro de leite.

4.1.2.1 - Efeitos de cada variável independente sobre a resposta solubilidade protéica

Os efeitos da concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg), pH e suas interações na resposta solubilidade protéica, podem ser observados na Tabela 8 e Figura 1.

Tabela 8: Efeitos principais e de interação das variáveis independentes na resposta solubilidade e seus erros padrão.

Fatores	Efeito (%)	Erro padrão
Média	0,3227*	0,0022*
Cp	-0,1005*	0,0052*
Cg	0,0756*	0,0052*
pH	-0,0385*	0,0052*
Cp x Cg	-0,0304*	0,0052*
Cp x pH	-0,0102	0,0052
Cg x pH	-0,0076	0,0052
Cp x Cg x pH	-0,0162	0,0052

* valores estatisticamente significativos

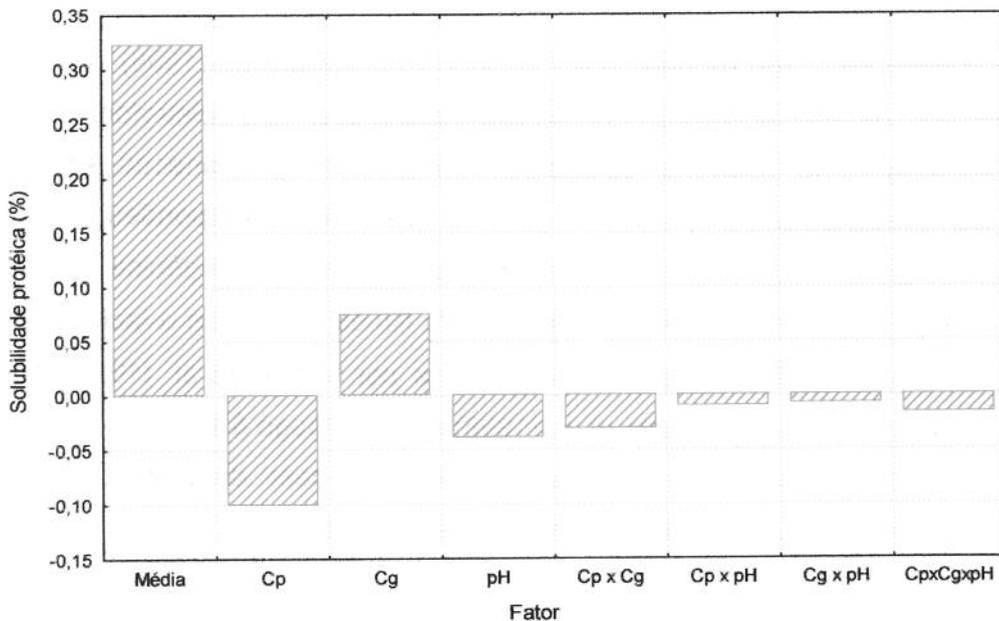


Figura 1: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na resposta solubilidade protéica dos filmes de soro de leite.

Um efeito negativo estatisticamente significativo foi encontrado quando a concentração de proteína e o pH passam do nível -1 (5,50% proteína e pH 5,90) para o +1 (7,50% proteína e pH 7,90) ou seja com o aumento da concentração de proteína e pH ocorreu uma diminuição na solubilidade dos filmes. A concentração de plastificante apresentou um efeito positivo, ou quanto mais plastificante foi adicionado maior a solubilidade protéica dos filmes a base de concentrado protéico de soro de leite.

Quantitativamente, um aumento na concentração de proteína de 5,50% para 7,50%, promoveu uma diminuição na solubilidade na ordem de 0,1005%, e um aumento do valor de pH de 5,90 para 7,90 promoveu uma diminuição de 0,0385% na solubilidade, ao contrário da concentração de plastificante, cujo aumento de 2,50% para 4,50% promoveu um aumento na solubilidade de 0,0756%. Portanto, a concentração de proteína foi o efeito mais significativo na resposta solubilidade protéica.

4.1.2.2 - Determinação do modelo empírico para a resposta solubilidade protéica

A análise de regressão, ou seja o ajuste por mínimos quadrados dos modelos lineares e quadráticos nos resultados obtidos pelo planejamento experimental, foi feita através do programa computacional Statistica version 5.0. A partir destes cálculos, foram obtidos os coeficientes dos polinômios ajustados. A Tabela 9 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático.

O modelo empírico que melhor se ajustou aos dados de solubilidade protéica foi o linear, sendo que a determinação foi feita através do coeficiente de determinação R^2 , que foi igual a 0,9951 para o modelo linear e 0,8308 para o modelo quadrático. E a falta de ajuste foi menor para o modelo linear que o quadrático.

Tabela 9: Análise da variância para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a resposta solubilidade protéica.

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)		Média Quadrática (MQ)		Graus de Liberdade		Teste F		R ²	
	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q
Regressão	0,0373	0,0405	0,0053	0,0045	7	9	85,84	3,81	0,9951	0,8308
Resíduo	0,0002	0,0083	0,0001	0,0012	3	7	-	-	-	-
Falta de Ajuste	0,0001	0,0082	0,0001	0,0016	1	5	-	-	-	-
Erro Puro	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	2	2	-	-	-	-
Total	0,0374	0,0488	-	-	10	16	-	-	-	-

L = modelo linear

Q = modelo quadrático

$F_{0,95,7,3}$ (Modelo Linear) = 8,89

$F_{calc} / F_{tab} = 9,66$ (Modelo Linear)

$F_{0,95,9,7}$ (Modelo Quadrático) = 3,68

$F_{calc} / F_{tab} = 1,04$ (Modelo Quadrático)

A avaliação da validade do modelo linear foi feita através do teste F, que confere a significância estatística do modelo. Comparando-se o valor do F calculado igual a 85,84 com o F tabelado igual a 8,89, a um nível de 95% de confiança, observou-se que o modelo linear é estatisticamente significativo e preditivo, uma vez que o F calculado é 9,66 vezes maior que o F tabelado. Segundo Neto et al. (2001), a regressão é estatisticamente significativa se $SQ_{Regressão}/SQ_{resíduo}$ for maior que o F tabelado, e é também preditiva quando o valor desta relação for aproximadamente dez vezes maior que o F tabelado (Box et al., 1978), mas esta é uma consideração que deve ser avaliada de acordo com o processo efetuado.

Os parâmetros do modelo foram determinados com a finalidade de diminuir os resíduos, que são a diferença entre os valores observados e os preditos pelo modelo. A Figura 2 apresenta os valores observados (experimentais) em função dos valores preditos pelo modelo, verificando a proximidade dos pontos experimentais com o modelo, ou seja, o modelo prevê o comportamento da solubilidade protéica nas faixas estudadas.

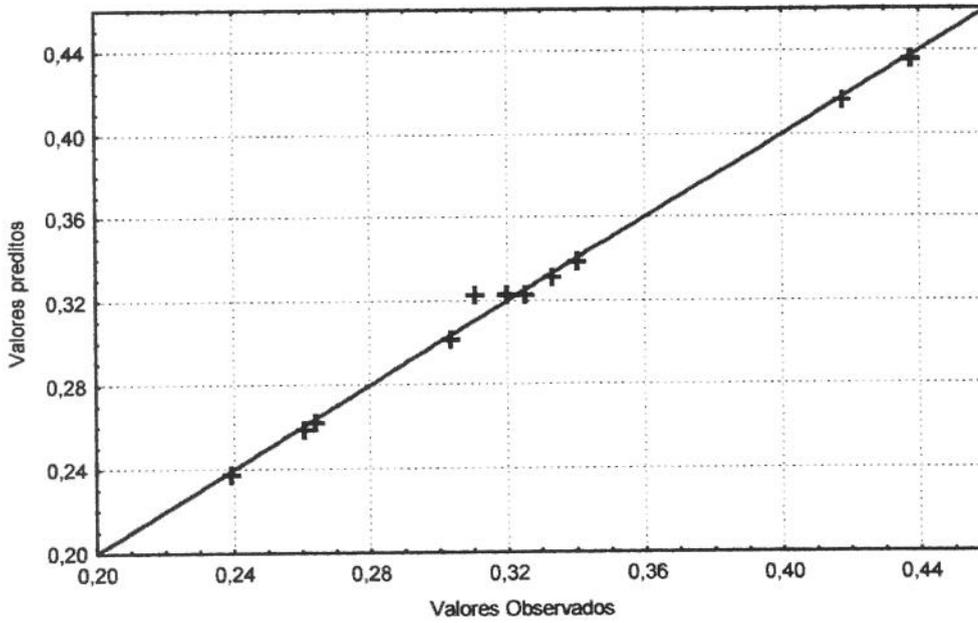


Figura 2: Valores observados em função dos valores preditos pelo modelo para a solubilidade protéica de filmes protéicos a base de proteínas do soro de leite.

Os coeficientes de regressão para um modelo linear que representa a solubilidade protéica, em função das variáveis independentes estudadas e suas interações estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Coeficientes de regressão estimados para a resposta solubilidade protéica.

Fatores	Coefficiente de Regressão
Média	0,3227*
Cp	-0,0502*
Cg	0,0378*
pH	-0,0193*
Cp x Cg	-0,0152*
Cp x pH	-0,0051
Cg x pH	-0,0038
Cp x Cg x pH	-0,0081

*- valores estatisticamente significativos

Considerando somente os coeficientes estatisticamente significativos, o modelo de 1ª ordem para solubilidade protéica de filmes a base de soro de leite, pode ser analisado abaixo:

$$\begin{aligned} \text{Solubilidade Protéica} = & 0,3227 - 0,0502 \times C_p + 0,0378 \times C_g - 0,0193 \times \text{pH} + \\ & - 0,0152 \times C_p \times C_g \end{aligned} \quad (\text{Eq. 23})$$

4.1.2.3 - Estudo das superfícies de resposta

As superfícies de resposta e as curvas de nível, obtidas a partir do modelo linear, estão apresentadas na Figura 3, ou seja, a relação entre as variáveis concentração de proteína (C_p), concentração de plastificante (C_g), pH e a solubilidade protéica, possibilitando a análise das melhores condições para a obtenção da menor solubilidade em filmes protéicos.

A partir da Figura 3a e 3b, concluiu-se que com o aumento da concentração de proteína (de 5,50% para 7,50%) e a diminuição da concentração de plastificante (de 4,50% para 2,50%), a solubilidade protéica diminuiu, ou seja, a solubilidade é menor para concentrações de proteína maiores e concentrações de plastificante menores.

O aumento da concentração de proteína promoveu uma menor solubilidade do filme protéico, estando associada a uma estrutura do filme mais compacta e resistente, indicando um maior número de ligações entre as cadeias protéicas, ou seja, uma matriz tridimensional filmogênica mais resistente, e um menor número de monômeros protéicos, peptídeos que não participaram da formação da matriz filmogênica. Quanto maior o número de grupos SH, mais ligações covalente dissulfídicas são formadas durante a secagem dos filmes protéicos, dificultando o acesso das moléculas de água aos grupos hidrofílicos das cadeias protéicas, reduzindo a solubilidade (Handa et al., 1999a).

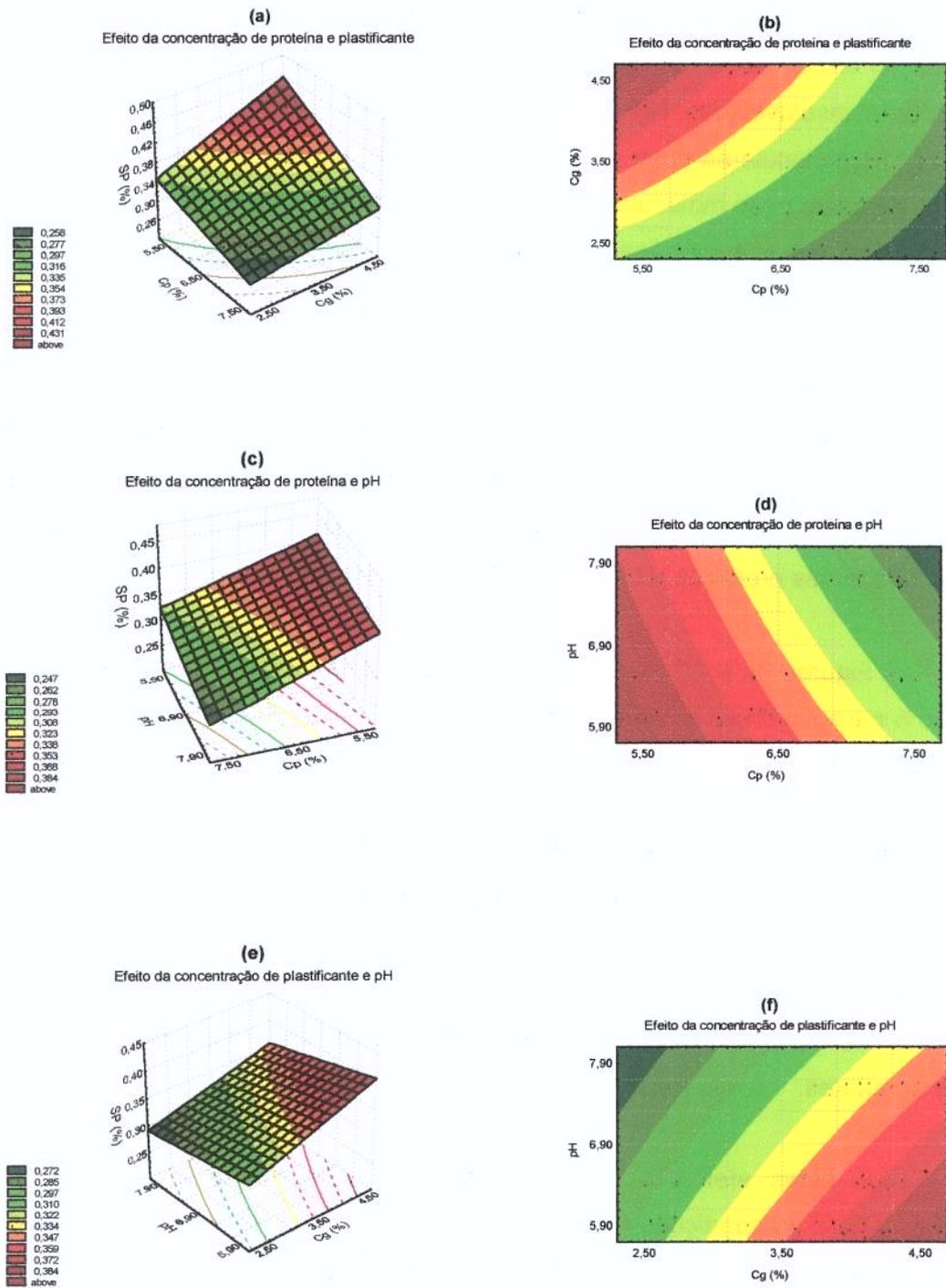


Figura 3: Superfícies de resposta e curvas de nível para a solubilidade protéica.

McHugh & Krochta (1994d); Fairley et al. (1996) e Galletta et al. (1998) afirmaram que filmes protéicos a base de proteínas do soro de leite são parcialmente insolúveis em água devido a presença de ligações dissulfídicas intermoleculares, resistindo a solubilização em tampões aquosos. Vachon *et al.* (2000) associaram a obtenção de uma maior fração insolúvel dos filmes a base de soro de leite ao aumento das reações cruzadas intermoleculares entre as proteínas. Cuq et al. (1997) concluíram que cadeias protéicas de baixo peso molecular (monômeros e peptídios pequenos), formadas durante a obtenção dos filmes e imobilizadas na rede protéica podem constituir a proteína solúvel encontrada para filmes a base de proteína miofibrilar de peixe.

Quanto maior a concentração de plastificante, maior foi a solubilidade protéica dos filmes (Figura 3a e 3b). O glicerol é um plastificante hidrofílico que alonga, dilui e afrouxa a estrutura dos filmes, resultando no aumento da capacidade de ligar-se a água. O mesmo resultado foi verificado por Mahmoud & Savello (1993) e Stuchell & Krochta (1995), para filmes protéicos a base de proteínas do soro de leite e de soja.

Nas Figuras 3c e 3d, observou-se que ao aumentar a concentração de proteína (de 5,50% para 7,50%) e ao aumentar o pH (de 5,90 para 7,90), uma menor solubilidade dos filmes foi encontrada. Quanto ao pH, verificou-se que a solubilidade é maior em pH ácido, ou seja, com o decréscimo do pH, a solubilidade protéica dos filmes aumenta, sendo explicada pela coagulação das proteínas em pH ácido, próximo ao *pI*, formando pequenos agregados protéicos solúveis na solução filmogênica, que não participaram da matriz polimérica. Analisando-se as Figuras 3e e 3f, concluiu-se que o aumento da concentração de plastificante (de 2,50% para 4,50%) e a diminuição do pH (de 7,90 para 5,90) promoveram uma solubilidade maior, confirmando as tendências observadas nas figuras anteriores.

Todos estes efeitos e interações resultaram na menor solubilidade protéica filmogênica para as condições de maior concentração de proteína, menor concentração de plastificante e valores de pH (básico), ou seja, a melhor formulação para a resposta solubilidade protéica nos filmes, consistiu em 7,50% de proteína, 2,50% de plastificante e pH 7,90, no intervalo e condições utilizadas para filmes protéicos a base de soro de leite.

4.1.3 - Permeabilidade ao vapor d'água

Os resultados de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos nas diferentes formulações foram apresentados na Tabela 7, a seguir estão as análises estatísticas efetuadas. A determinação do tempo de incubação correspondente a 5 dias (120 horas) para a permeabilidade ao vapor d'água foi baseada na prévia determinação do tempo de equilíbrio para os filmes em cada ensaio (para todas as formulações). As amostras foram acondicionadas a 25°C e UR=75% nas células de permeabilidade contendo uma massa de sílica pré-fixada, como dessecante, e foram feitas pesagens diárias, até atingir peso constante. A escolha deste tempo foi para ter certeza de determinar a permeabilidade ao vapor d'água no estado estacionário.

A principal função dos filmes comestíveis é impedir a transferência de umidade, gases e outros entre o alimento e o ambiente, assim a permeabilidade ao vapor d'água deve ser a mais baixa possível.

4.1.3.1 - Efeitos de cada variável sobre a resposta permeabilidade ao vapor d'água

Na Tabela 11 e Figura 4, estão apresentados os valores dos efeitos da concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg), pH e suas interações para a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos a base de soro de leite. Os efeitos da concentração de proteína e concentração de plastificante sobre a permeabilidade ao vapor d'água são positivos estatisticamente significativos, da mesma forma a interação entre as três variáveis. O pH e a interação da concentração de proteína e o pH promoveram um efeito negativo estatisticamente significativo.

Quantitativamente, o aumento de 5,50% (nível -1) na concentração de proteína para 7,50% (nível +1), promoveu um aumento de 0,0960 gmm/hm²kPa na permeabilidade, e o aumento na concentração de plastificante de 2,50% para 4,50% promoveu um aumento de 0,0289 gmm/hm²kPa, ao contrário do pH, que ao aumentar de 5,90 para 7,90, ocorreu um decréscimo na permeabilidade na ordem de 0,0399

gmm/hm²kPa. Apesar das variáveis Cp e Cg apresentarem um efeito positivo, a combinação entre as duas apresentou um efeito negativo, indicando que a interação dos mesmos não favoreceu a formação de uma rede compacta. Assim, o efeito mais significativo foi a concentração de proteína na resposta permeabilidade ao vapor d'água.

Tabela 11: Efeitos principais e de interação das variáveis independentes na resposta permeabilidade ao vapor d'água e seus erros padrão.

Fatores	Efeito (%)	Erro padrão
Média	0,2370*	0,0023*
Cp	0,0960*	0,0054*
Cg	0,0289*	0,0054*
pH	-0,0399*	0,0054*
Cp x Cg	-0,0056	0,0054
Cp x pH	-0,0503*	0,0054*
Cg x pH	0,0227	0,0054
Cp x Cg x pH	0,0302*	0,0054*

* - valores estatisticamente significativos

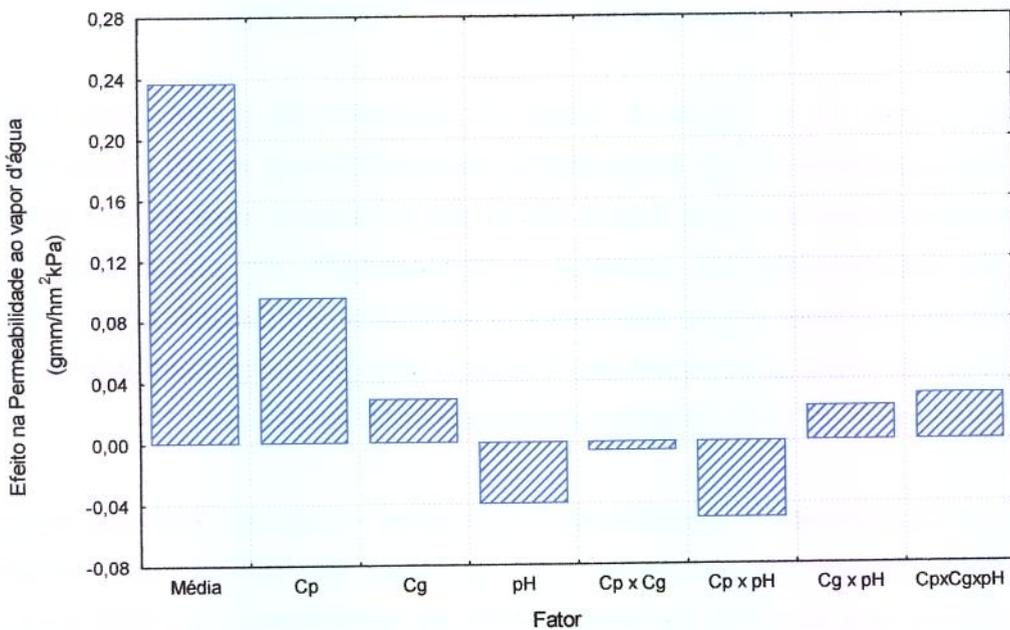


Figura 4: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na resposta permeabilidade ao vapor d'água.

4.1.3.2 - Determinação do modelo empírico

A análise de regressão consistiu no ajuste por mínimos quadrados dos modelos lineares e quadráticos aos resultados obtidos pelo planejamento fatorial, efetuado pelo programa computacional Statistica version 5.0. A partir destes cálculos foram obtidos os coeficientes dos polinômios ajustados. A Tabela 12 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático.

Tabela 12: Análise da variância para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a permeabilidade ao vapor d'água.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)		Média Quadrática (MQ)		Graus de Liberdade		Teste F		R ²	
	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q
Regressão	0,0312	0,0496	0,0052	0,0055	6	9	14,75	1,91	0,9698	0,7101
Resíduo	0,0009	0,0203	0,0002	0,0029	4	7	-	-	-	-
Falta de Ajuste	0,0009	0,0201	0,0004	0,0040	2	5	-	-	-	-
Erro Puro	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	2	2	-	-	-	-
Total	0,0322	0,0699	-	-	10	16	-	-	-	-

L = modelo linear

Q = modelo quadrático

$F_{0,95;6;4}$ (Modelo Linear) = 6,16

$F_{calc} / F_{tab} = 1,66$ (Modelo Linear)

$F_{0,95;9;7}$ (Modelo Quadrático) = 3,68

$F_{calc} / F_{tab} = 0,52$ (Modelo Quadrático)

Verificou-se que a correlação R² é igual a 0,9698 para o modelo linear e 0,7101 para o modelo quadrático, e a falta de ajuste do modelo linear foi menor que o quadrático, então o modelo linear foi o melhor para representar a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes a base de proteínas do soro de leite. O teste F foi feito para conferir a significância estatística do modelo linear, comparando-se o valor do F calculado igual a 14,75 com o F tabelado igual a 6,16, a um nível de confiança de 95%, observou-se que o modelo é estatisticamente significativo, mas não preditivo, uma vez que o F calculado é 1,66 vezes maior que o F tabelado.

No caso dos filmes protéicos a base de soro de leite, o intervalo das concentrações testado não foi adequado para obter uma regressão preditiva, mas é importante ressaltar que o concentrado protéico de soro de leite é constituído por 5 tipos de proteínas, com possibilidades de ligações em pontos diferentes da cadeia, dificultando uma reprodutibilidade exata das ligações entre as cadeias protéicas durante a formação dos filmes, considerando que, a matriz filmogênica é estabilizada por um equilíbrio de forças atrativas e repulsivas de diferentes tipos (interações hidrofóbicas e iônicas, pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals, ligações covalentes dissulfídicas).

4.1 3.3 - Estudo das superfícies de resposta

As análises das superfícies de resposta e curvas de nível, obtidas a partir do modelo linear, estão apresentadas na Figura 5, permitindo a visualização de uma melhor formulação para a permeabilidade ao vapor d'água. A partir das Figuras 5a e 5b, observou-se que com o aumento da concentração de proteína (de 5,50% para 7,50%) e o aumento na concentração de plastificante (2,50% para 4,50%), a permeabilidade ao vapor d'água aumenta. Desta forma, para uma menor permeabilidade ao vapor d'água, as quantidades de proteína e plastificante adicionadas devem ser as menores possíveis.

Uma maior quantidade de proteína provocou um aumento significativo na permeabilidade ao vapor d'água, associado à presença de bolhas de ar, difíceis de serem retiradas, devido à alta viscosidade da solução filmogênica. A quantidade de bolhas e defeitos influenciou diretamente nas características de permeabilidade em filmes a base de celulose (Park & Chinnan, 1995), e em filmes a base de isolado protéico de soro de leite (McHugh et al., 1994).

A resistência de filmes protéicos à transferência de vapor d'água foi limitada, devido à hidrofiliabilidade das proteínas do soro de leite, sendo facilitada pela presença do glicerol, um plastificante hidrofílico, que favoreceu a adsorção das moléculas de água.

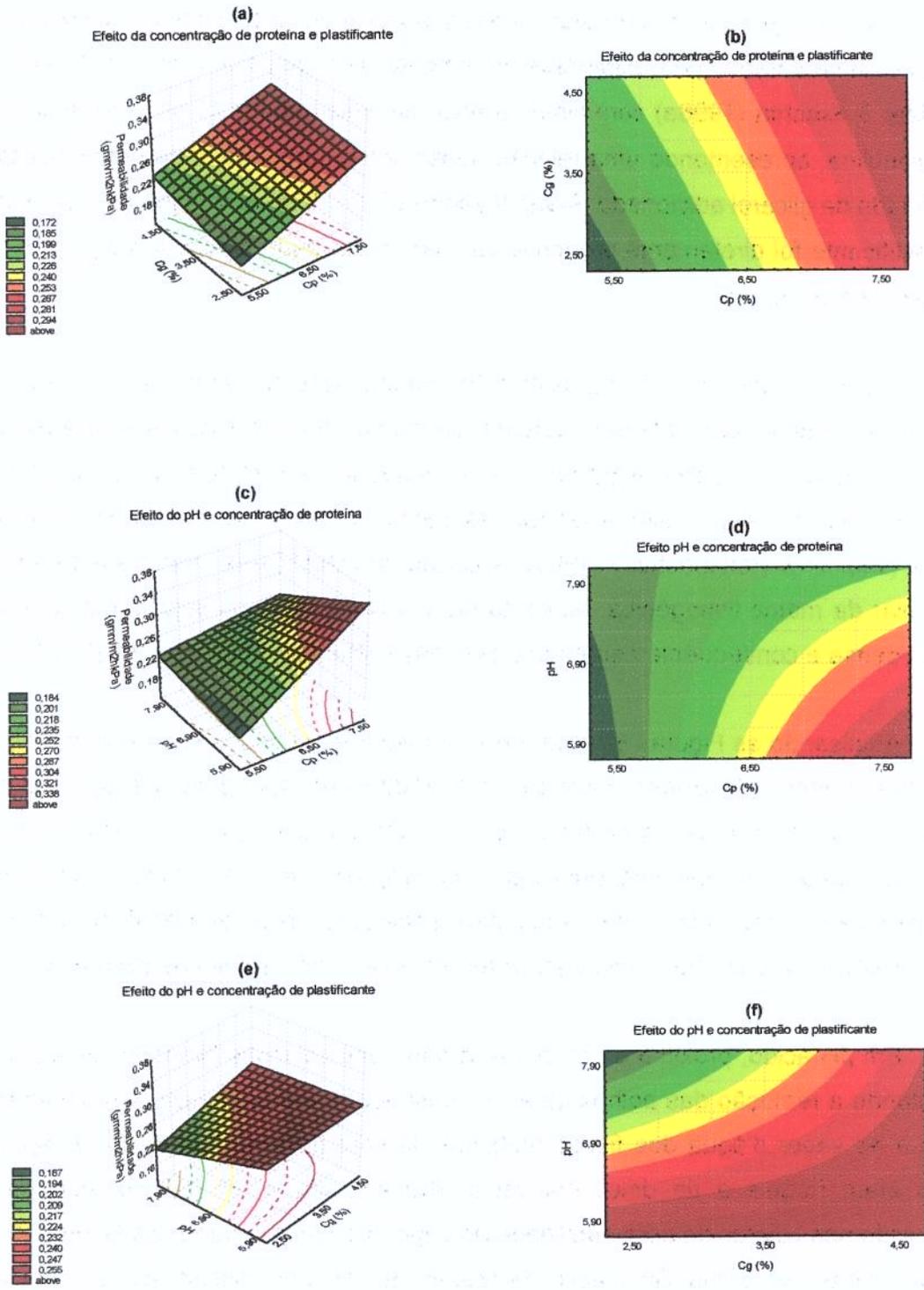


Figura 5: Superfícies de resposta e curvas de nível para a permeabilidade ao vapor d'água.

Liebermann & Gilbert (1973) afirmaram que plastificantes reduziram as ligações internas de hidrogênio e aumentaram o espaço intermolecular, contudo decresceram a dureza e aumentaram a permeabilidade de materiais filmogênicos. O mesmo foi conferido por Maté & Krochta (1996a) com filmes a base de isolado protéico de soro de leite e β -lactoglobulina, apresentando uma relação quase linear para o valor de permeabilidade e quantidade de glicerol adicionada. Arvanitoyannis et al. (1998) determinaram que a adição de plastificante foi diretamente proporcional a permeabilidade ao vapor d'água em filmes de gelatina e quitosana.

O glicerol, utilizado como plastificante, reduziu as forças intermoleculares entre as cadeias de proteína, aumentando o volume livre do polímero, criando espaços vazios para a água e outras moléculas migrarem. A concentração de plastificante, a morfologia do filme e o grau de reação cruzada são fatores que influenciam na permeabilidade ao vapor d'água (Yildirim & Hettiarachchy, 1998). A adição de plastificante modifica a organização molecular da matriz filmogênica, aumentando o volume livre, ou seja, a matriz torna-se menos densa e conseqüentemente mais permeável (Banker, 1966; Cuq et al., 1997).

Analisando as Figuras 5c e 5d, observou-se que quanto maior a concentração de proteína e menor o pH (ácido), maior a permeabilidade ao vapor d'água. Então o aumento da concentração de proteína de 5,50% para 7,50% e a diminuição do pH de 7,90 para 5,90, provocaram um aumento significativo na resposta permeabilidade. A partir destas considerações, para obter uma menor permeabilidade, deve-se trabalhar com baixas concentrações de proteína, como visto anteriormente, e em regiões de pH básico.

Em pH ácido, próximo ao pI, a viscosidade das soluções filmogênicas aumentou, dificultando a remoção das bolhas de ar, e conseqüentemente reduziu a propriedade de barreira ao vapor d'água dos filmes protéicos de soro de leite. Nestas formulações, os filmes eram frágeis e de difícil manuseio. Aumentando o pH (básico) ocorreu uma diminuição nos valores da permeabilidade ao vapor d'água, e segundo McHugh & Krochta (1994a), atribuí-se à inibição parcial da reação de troca tiol-dissulfídica e a reação de oxidação na região de pH ácido. O abaixamento do pH pode ser responsável pelo desdobramento das proteínas com exposição de resíduos hidrofílicos na superfície

protéica, aumentando a afinidade das proteínas pelo vapor d'água, promovendo uma maior transferência de água (Gontard et al., 1992).

A partir das Figuras 5e e 5f, concluiu-se que em altas concentrações de plastificante (4,50%), o pH não exerceu influência na permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos de soro de leite.

A título de comparação, utilizando as mesmas condições para a obtenção dos valores de permeabilidade ao vapor de água, foi feito para papel celofane e filme de PVC (cloreto de polivinil), obtendo valores de 0,0100 e 0,0247gmm/hm²kPa, respectivamente. Isto indica que os filmes protéicos a base de soro de leite apresentaram permeabilidade ao vapor d'água de aproximadamente 15 a 43 vezes maior que o celofane e de aproximadamente 7 a 17 vezes maior que o filme de PVC, dependendo da formulação dos filmes protéicos.

A melhor formulação para a resposta permeabilidade ao vapor d'água, no intervalo e condições trabalhadas, consistiu na menor concentração de proteína (5,50%), a menor concentração de plastificante (2,50%) e em pH básico (7,90).

4.1.4 - Tensão na ruptura e alongação

A tensão na ruptura e a porcentagem de alongação representam as propriedades mecânicas de filmes protéicos, indicando a integridade esperada do filme sob condições de tensão que poderiam ocorrer durante o processamento, manuseio e estocagem, e estão diretamente relacionadas com a estrutura filmogênica, ou seja, as ligações presentes na matriz protéica. As mudanças nestas propriedades caracterizam modificações na organização tridimensional, decrescendo a densidade e reversibilidade das interações intermoleculares ocorridas na rede protéica formadora do filme e aumentando o volume vazio e a mobilidade da cadeia (Galiotta et al., 1998). A análise estatística dos resultados de tensão na ruptura e alongação apresentada na Tabela 7 foi descrita separadamente para cada resposta, nos itens abaixo.

4.1.4.1 - Efeitos sobre a resposta tensão na ruptura

A tensão na ruptura é a máxima força de tração que o filme pode sustentar antes de romper, e está diretamente relacionada com a ordem de grandeza da energia nas ligações intermoleculares presentes na matriz filmogênica (Robertson, 1993). Os valores dos efeitos da concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg) e pH para a tensão na ruptura estão apresentadas na Tabela 13 e Figura 6.

Tabela 13: Efeitos principais das variáveis independentes na resposta tensão na ruptura.

Fatores	Efeito (MPa)	Erro Padrão
Média	4,2054*	0,0116*
Cp	0,4493*	0,0273*
Cg	-1,1298*	0,0273*
pH	0,1109	0,0273
Cp x Cg	-0,2164*	0,0273*
Cp x pH	0,1058	0,0273
Cg x pH	0,4681*	0,0273*
Cp x Cg x pH	-0,1316*	0,0273*

*- valores estatisticamente significativos

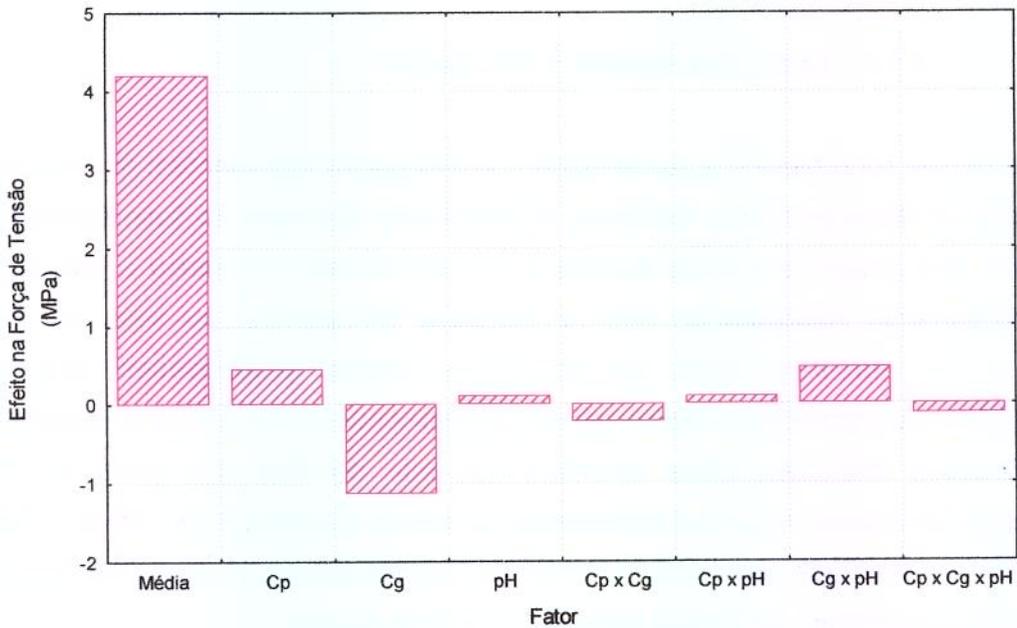


Figura 6: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na tensão na ruptura.

Os efeitos da concentração de proteína e a interação entre a concentração de plastificante e pH são estatisticamente significativos e positivos, ao contrário da concentração de plastificante, e as interações entre a concentração de proteína e plastificante e as três variáveis, que produziram um efeito estatisticamente significativo e negativo. Quantitativamente, um aumento na concentração de proteína de 5,50% (nível - 1) para 7,50% (nível +1), promoveu um aumento na tensão na ruptura na ordem de 0,4493MPa; ao contrário, quando se aumentou a concentração de plastificante de 2,50% para 4,50%, ocorreu um decréscimo de 1,1298MPa. Conclui-se que a concentração de glicerol foi a variável que provocou maior efeito na tensão na ruptura dos filmes protéicos.

4.1.4.2 - Determinação do modelo para tensão na ruptura

A análise de regressão foi feita através do programa Statistica version 5.0, onde os resultados obtidos pelo planejamento experimental foram ajustados por mínimos quadrados em modelos linear e quadrático. A Tabela 14 apresenta a análise da variância para o ajuste do modelo linear e quadrático, possibilitando avaliar a validação do melhor modelo.

Tabela 14: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a resposta tensão na ruptura.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)		Média Quadrática		Graus de Liberdade		Teste F		R ²	
	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q
Regressã	3,5698	12,9003	0,5099	1,4334	7	9	0,74	6,40	0,6318	0,8915
Residuo	2,0799	1,5686	0,6933	0,2241	3	7	-	-	-	-
Falta de Ajuste	2,0769	1,5656	2,0769	0,3131	1	5	-	-	-	-
Erro Puro	0,0029	0,0029	0,0015	0,0015	2	2	-	-	-	-
Total	5,6497	14,4689	-	-	10	16	-	-	-	-

L = modelo linear

Q = modelo quadrático

$F_{0,95;7;3}$ (Modelo Linear) = 8,89

$F_{calc} / F_{tab} = 0,08$ (Modelo Linear)

$F_{0,95;9;7}$ (Modelo Quadrático) = 3,68

$F_{calc} / F_{tab} = 1,74$ (Modelo Quadrático)

A correlação R^2 é igual a 0,6318 para o modelo linear e 0,8915 para o modelo quadrático, concluindo ser o modelo quadrático o melhor para representar a tensão na ruptura dos filmes protéicos a base de soro de leite. A falta de ajuste foi menor para o modelo quadrático. Através do teste F, conferiu-se a significância estatística do modelo quadrático para tensão na ruptura, onde se comparando o F calculado igual a 6,40 com o F tabelado igual a 3,68, a um nível de 95% de confiança, e condições estudadas, obtém-se um modelo estatisticamente significativo, uma vez que o F calculado é 1,74 vezes maior que o F tabelado, mas não preditivo segundo Neto et al. (2001).

4.1.4.3 - Estudo das superfícies de resposta para tensão na ruptura

Através da análise das superfícies de resposta e curvas de nível, obtidas pelo modelo quadrático, determinou-se uma melhor formulação para a tensão na ruptura, dentro do intervalo estudado para a obtenção de filmes protéicos de soro de leite. As superfícies e as curvas de nível para a resposta tensão na ruptura em função das variáveis independentes estão apresentadas na Figura 7.

A influência da concentração de proteína e plastificante na tensão na ruptura pode ser analisada nas Figuras 7a e 7b, onde a tensão na ruptura foi maior para altas concentrações de proteína e baixas concentrações de plastificante. O aumento da quantidade de glicerol provocou um decréscimo na tensão na ruptura dos filmes protéicos de soro de leite, onde o plastificante atua reduzindo a força de atração entre as cadeias de proteína, aumentando a flexibilidade, mas também reduzindo a rigidez da matriz filmogênica.

Em geral, a tensão na ruptura é influenciada pela interação entre as proteínas na matriz filmogênica, em diversos sítios ativos das cadeias protéicas e, os plastificantes reduzem o número destas ligações através da solvatação de sítios ativos polares, resultando em uma menor densidade de energia coesiva e conseqüentemente diminui o valor de tensão na ruptura (Santosa & Padua, 1999; Lim et al, 1998).

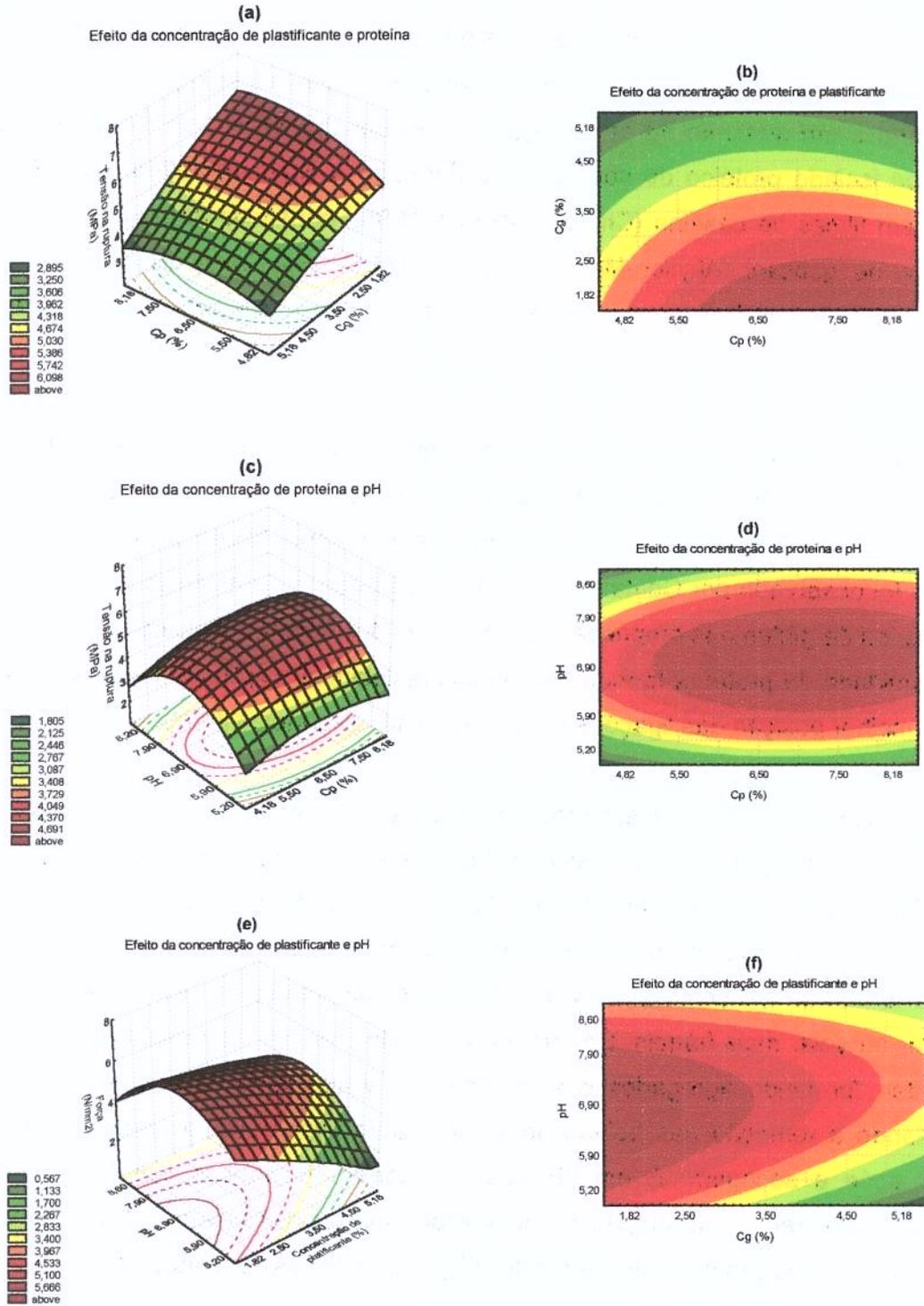


Figura 7: Superfícies de resposta e curvas de nível para a tensão na ruptura.

Fairley et al. (1996) constataram que em diferentes tipos de filmes comestíveis, ao aumentar a concentração de plastificante, ocorreu uma diminuição significativa na tensão na ruptura e um aumento na porcentagem de alongação. O mesmo foi observado em filmes de isolado protéico de soro de leite (McHugh & Krochta, 1994b; Kaya & Kaya, 2000); em filmes de caseína (Chick & Ustunol, 1998); em filmes de isolado protéico de semente de girassol (Ahyllon-Meixueiro *et al.*, 2000); em filmes de gelana (Yang & Paulson, 2000b); em filmes combinados de caseinato de sódio e amido (Arvanitoyannis & Biliaderis, 1998).

Quanto maior a concentração de proteína, maior a quantidade de grupos sulfidrílicos na superfície protéica, promovendo um maior número de ligações covalentes S-S na matriz filmogênica, conseqüentemente formando filmes mais resistentes. O mesmo foi observado por Gontard et al. (1992), verificando a influência da concentração de proteína de glúten nas propriedades mecânicas dos filmes, concluindo que o aumento na quantidade de proteína formou filmes mais resistentes, explicado pelo maior número e/ou a melhor posição das ligações covalentes entre as cadeias protéicas.

A relação entre a concentração de proteína e pH pode ser observada nas Figuras 7c e 7d, onde a região entre valores de pH 5,90 a 7,90 e para concentrações de proteína entre 5,50% e 8,18%, definiu uma maior tensão na ruptura. O filme apresentou-se mais resistente nestas faixas de operação, sendo que mostrou sua maior força em pH neutro. Filmes formados em condições extremas de pH, apresentaram uma menor tensão na ruptura, ou seja, mais frágeis. Em pH ácido (próximo ao pI), as proteínas tendem a se precipitar, formando agregados e aumentando a viscosidade da solução filmogênica, dificultando a remoção das bolhas de ar, formando filmes com a presença de poros, falhas após a secagem. E em pH básico, ocorrem mudanças estruturais onde as proteínas adquirem carga negativa, provocando uma repulsão eletrostática, reduzindo a interação proteína-proteína, aumentando a ligação entre as cadeias protéicas durante a formação dos filmes (Anker et al., 1999; Zirbel & Kinsella, 1988).

O pH influencia as interações sulfidril-dissulfídica na polimerização das proteínas e gelatinização. Segundo Morr & Ha (1993), o concentrado protéico de soro de leite apresenta excelente capacidade gelatinizante em pH 7,0, sendo que a reatividade dos

grupos SH das proteínas aumenta em pH alcalino, e diminui em pH ácido, formando uma matriz somente através de pontes de hidrogênio. Nas Figuras 7e e 7f, confirmando os resultados anteriores, a maior força foi encontrada em menores concentrações de plastificante e valores de pH na faixa entre 5,90 e 7,90.

A melhor formulação obtida para a resposta tensão na ruptura, nas condições e intervalo estudados consistiu na concentração de proteína entre 5,50% e 8,18%. na menor concentração de plastificante (1,82%), e valor de pH entre 5,90 e 7,90.

4.1.4.4 - Efeitos de cada variável sobre a resposta alongação

A alongação corresponde à máxima variação no comprimento da amostra antes da quebra ou ruptura, mede a capacidade de esticar (Robertson, 1993). Os valores dos efeitos das variáveis estudadas, concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg), pH e suas interações para a porcentagem de alongação dos filmes protéicos estão apresentados na Tabela 15 e Figura 8. As três variáveis apresentaram efeitos positivos estatisticamente significativos, assim como as interações da concentração de plastificante e pH. A interação entre a concentração de proteína e plastificante, e a interação entre as três variáveis promoveram efeitos negativos estatisticamente significativos.

Tabela 15: Efeitos principais das variáveis independentes na resposta alongação.

Fatores	Efeito (%)	Erro Padrão
Média	25,41*	0,29*
Cp	5,89*	0,68*
Cg	16,45*	0,68*
pH	26,94*	0,68*
Cp x Cg	-10,71*	0,68*
Cp x pH	2,27	0,68
Cg x pH	9,74*	0,68*
Cp x Cg x pH	-7,50*	0,68*

*- valores estatisticamente significativos

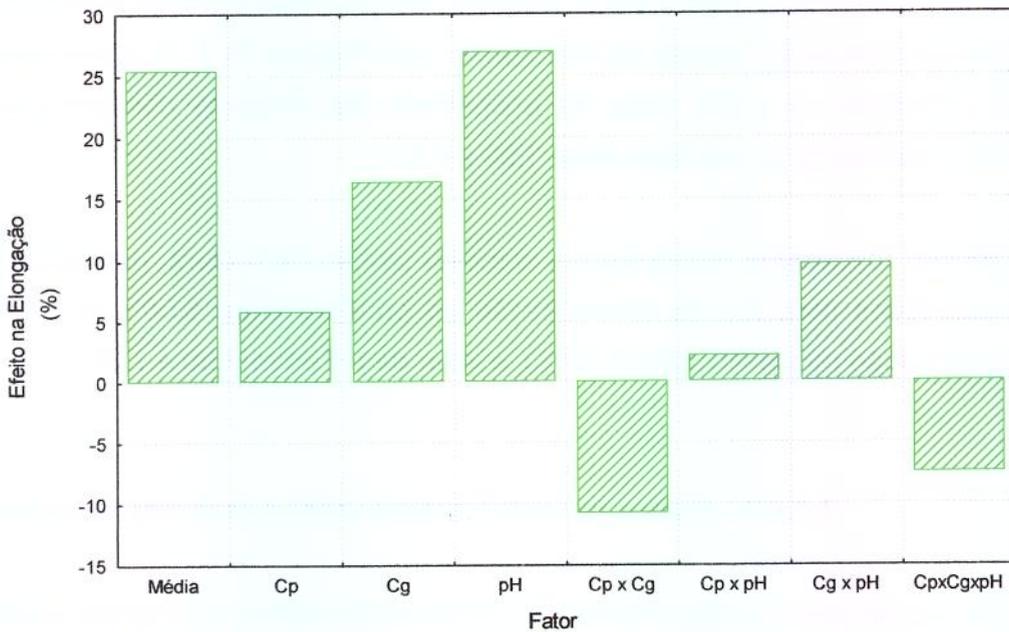


Figura 8: Efeitos das variáveis independentes e suas interações na resposta percentagem de elongação.

Quantitativamente, o aumento da concentração de proteína de 5,50% (nível -1) para 7,50% (nível +1), promoveu um aumento na porcentagem de elongação na ordem de 5,89%; e um aumento na concentração de plastificante de 2,50% para 4,50% aumenta em 16,45% a elongação; e variando-se o pH de 5,90 para 7,90, aumenta a porcentagem de elongação em 26,94%. Desta forma, o maior efeito encontrado foi variando o valor do pH de ácido para básico na porcentagem de elongação dos filmes protéicos.

4.1.4.5 - Determinação do modelo empírico para elongação

Utilizando-se o programa computacional Statistica version 5.0, foi feita a análise de regressão, onde os modelos linear e quadrático foram ajustados por mínimos quadrados nos resultados obtidos pelo planejamento fatorial. Através da análise da variância para o ajuste dos modelos linear e quadrático, foi possível avaliar a validação do melhor modelo representando a elongação dos filmes protéicos de soro de leite (Tabela 16).

Tabela 16: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear e quadrático para a resposta porcentagem de alongação.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)		Média Quadrática (MQ)		Graus de Liberdade		Teste F		R ²	
	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q
Regressão	2603,86	4967,20	371,98	551,91	7	9	9,03	4,87	0,9547	0,8624
Resíduo	123,60	792,67	41,20	113,24	3	7	-	-	-	-
Falta de Ajuste	121,78	790,85	121,78	158,17	1	5	-	-	-	-
Erro Puro	1,83	1,83	0,92	0,91	2	2	-	-	-	-
Total	2727,46	5759,87	-	-	10	16	-	-	-	-

L = modelo linear

Q = modelo quadrático

$F_{0,95;7;3}$ (Modelo Linear) = 8,89

$F_{calc} / F_{tab} = 9,03$ (Modelo Linear)

$F_{0,95;9;7}$ (Modelo Quadrático) = 3,68

$F_{calc} / F_{tab} = 1,32$ (Modelo Quadrático)

Os valores da correlação R² para cada modelo foram 0,9547 para o modelo linear e 0,8624 para o modelo quadrático, portanto o modelo linear foi o que melhor representou a porcentagem de alongação dos filmes. Para conferir a significância estatística do modelo linear foi feito o teste F. Comparando-se o F calculado da relação entre a soma quadrática da regressão com a do resíduo, sendo igual a 9,03 e o F tabelado igual a 8,89, a um nível de confiança de 95%, concluiu-se ser um modelo estatisticamente significativo e não preditivo, uma vez que o F calculado é 1,32 vezes maior que o F tabelado, nas condições de processo estipuladas. E a significância pode ser confirmada pelo F da soma quadrática da falta de ajuste em relação ao erro puro (66,55), maior que o F tabelado (18,51), a 95% de confiança.

4.1.4.6 - Estudo das superfícies de resposta alongação

A análise das superfícies de resposta e curvas de nível permitiu determinar uma melhor formulação para a porcentagem de alongação, nas condições e intervalos de processo trabalhados. A Figura 9 apresenta as superfícies de resposta e curvas de nível obtidas através do modelo linear.

Nas Figuras 9a e 9b pode-se observar o efeito provocado pela concentração de proteína e concentração de plastificante. A alongação é alta em toda a faixa de concentração de proteína estudada, sendo maior entre 5,50% e 6,50%; e aumentando a concentração de plastificante, promoveu-se maior alongação. A maior capacidade de estender (maior alongação) foi atingida quando se trabalhou com concentração de proteína entre 5,50 e 7,50% e altas concentrações de plastificante. O tamanho, número de carbonos na cadeia e o número de grupos hidroxila funcionais nas moléculas de plastificante influenciaram as propriedades mecânicas, favorecendo a ligação com moléculas de água, que atuam como plastificante na matriz filmogênica, aumentando a porcentagem de alongação e diminuindo a tensão na ruptura.

A adição de alta concentração de plastificante na formulação filmogênica provoca mudanças significativas nas propriedades mecânicas do filme, aumentando a capacidade de estender e flexibilidade (Galiotta et al., 1998). O mesmo foi obtido por McHugh & Krochta (1994a) para filmes a base de concentrado protéico de soro de leite; por Santosa & Padua (1999) para filmes de zeína do milho e por Arvanitoyannis & Biliaderis (1998) em filmes combinados de caseinato de sódio e amido.

O efeito da concentração de proteína e pH na alongação pode ser analisado através das Figuras 9c e 9d. Quanto maior o valor de pH (básico) e para a concentração de proteína na faixa entre 5,50 e 7,50%, maior foi a alongação dos filmes protéicos a base de soro de leite. A diminuição do pH promoveu uma insolubilidade parcial das proteínas, provocando um desenvolvimento estrutural limitado, tornando os filmes mais frágeis. Gennadios et al. (1993c) determinaram uma maior alongação em filmes de isolado protéico de soja em pH bem acima do pI (ponto isoelétrico). Handa et al. (1999b) observaram que a porcentagem de alongação aumentou proporcionalmente com o valor de pH em filmes de proteínas da clara de ovo.

A alcalinidade favoreceu a exposição de grupos SH, sendo que uma maior quantidade de grupos SH na superfície resultou em um aumento das ligações covalentes S-S nos filmes, caracterizando-se pela formação de filmes mais estáveis e com maior capacidade de estender. O mesmo foi discutido por Fairley et al. (1996), onde grupos SH livres associaram-se positivamente na capacidade de estender de filmes a base de isolado protéico de soro de leite, e por Okamoto (1978) para filmes de glúten de trigo.

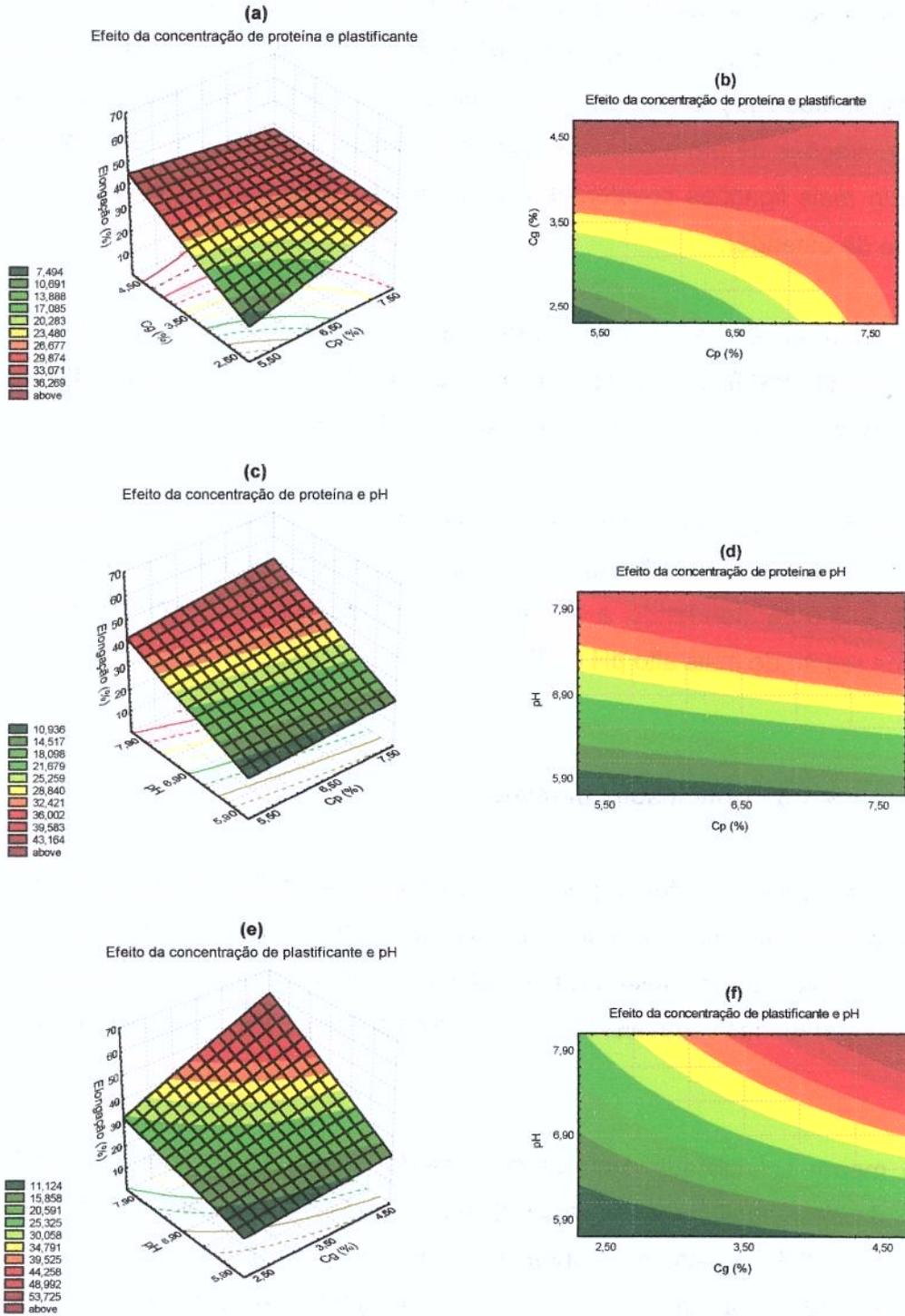


Figura 9: Superfícies de resposta e curvas de nível para a porcentagem de alongação.

O impedimento da troca sulfidril/dissulfídica provocou mudanças na conformação protéica que conduz o aumento nas pontes de hidrogênio, isto poderia contrabalancear a perda de resistência e o aumento da capacidade de estender que poderia ser esperada pela repressão das ligações dissulfídicas (Fairley et al., 1996). Da mesma maneira, para altas concentrações de proteína, uma maior quantidade de grupos SH são adicionados, promovendo mais ligações covalentes S-S, formando filmes mais estáveis, com maior capacidade de estender.

As Figuras 9e e 9f confirmaram as conclusões acima: quanto maior a concentração de plastificante e maior o valor do pH (básico), maior foi a porcentagem de alongação apresentada pelo filme protéico de soro de leite.

Uma melhor formulação para a porcentagem de alongação, dentro das condições e intervalos de processo trabalhados, consistiu em uma concentração de proteína na faixa de 5,50% e 7,50% (tendendo a ser maior), na maior concentração de plastificante (4,50%), na região de mais alto pH (7,90).

4.1.5 - Conclusões parciais

O planejamento fatorial permitiu determinar a melhor formulação de filmes protéicos a base de soro de leite, com os parâmetros pré-estipulados de processo, verificando através das características mecânicas e de barreira favoráveis e avaliando a importância (efeito) das variáveis, concentração de proteína, concentração de plastificante e pH.

A menor solubilidade protéica do filme foi obtida para maior Cp (7,50%), ao contrário da permeabilidade ao vapor d'água que foi menor para concentrações de proteína de 5,50%. Quanto às propriedades mecânicas, a tensão na ruptura foi maior entre 5,50- 8,18% e a maior porcentagem de alongação encontrada foi na faixa entre 5,50-7,50% de proteína. É interessante trabalhar com características boas de barreira e mecânicas, sendo que uma concentração intermediária de proteína seria mais adequada

(6,00-6,50%), pois não acarreta uma alta solubilidade, uma alta permeabilidade ao vapor d'água e com boas propriedades mecânicas.

A adição de glicerol favoreceu as propriedades mecânicas, mas diminuiu as propriedades de barreira de filmes protéicos. A menor quantidade de plastificante adicionada (2,50%) resultou em um menor valor de solubilidade protéica e permeabilidade ao vapor d'água. E quanto à tensão na ruptura, apresentou-se maior para 1,82% de plastificante, mas, reduziu a eficácia quanto a capacidade de estender (alongação) do filme, sendo esta maior para concentração de plastificante igual a 4,50%. Portanto, para manter a integridade mecânica, satisfazendo as condições de barreira dos filmes, a faixa de concentração de plastificante ideal para trabalhar foi 3,00-3,50%.

O pH básico (7,90) promoveu as melhores características mecânicas e de barreira, apenas ressaltando a tensão na ruptura que encontrou uma melhor região na faixa entre 5,90 e 7,90. O uso de filmes como embalagens em alimentos deve considerar que o desenvolvimento microbiano é favorecido em pH básico.

A partir da análise estatística do planejamento experimental, verificou-se que somente a solubilidade protéica apresentou um modelo significativo e preditivo, sendo que a permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura, porcentagem de alongação apresentaram modelos estatisticamente significativos. O concentrado protéico de soro de leite é constituído por diferentes tipos de proteínas, que são as responsáveis pela formação da matriz filmogênica através de ligações entre suas cadeias protéicas por pontes de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas e ligações dissulfídicas, equilibrando forças atrativas e repulsivas. Assim, é difícil garantir a reprodutibilidade exata das ligações na matriz filmogênica, justificando a não obtenção de modelos preditivos, mas significativos.

Para aplicar filmes em sistemas alimentícios, é importante desenvolver características mecânicas e de permeabilidade favoráveis, contudo estas análises combinadas de prever o comportamento do filme e definir a relação entre estrutura e função são bastante complexas (McHugh & Krochta, 1994d). O planejamento experimental é considerado uma ferramenta estatística para determinar efeitos de

variáveis no desenvolvimento de um produto novo. No caso dos filmes protéicos a base de soro de leite, esta ferramenta permitiu verificar o efeito das variáveis, concentração de proteína, concentração de plastificante e pH nas características de barreira e mecânica.

Gontard et al. (1992) afirmaram que ao invés de determinar o ponto ótimo para as superfícies de resposta, é melhor escolher combinações de formulação baseadas na ênfase nas características requeridas para o seu uso específico, técnica de aplicação ou outras considerações. Por exemplo, se o filme for usado para coberturas superficiais para manuseio, as propriedades principais para otimizar são as propriedades mecânicas e aparência; ou, se o filme for usado como barreira ao vapor d'água entre dois componentes de produtos alimentícios heterogêneos, requer-se um filme com a mais baixa permeabilidade ao vapor d'água.

A melhor formulação determinada neste caso de filmes protéicos a base de soro de leite, visando manter boas características de barreira e mecânicas, foi: concentração de proteína 6,50%; concentração de plastificante 3,00% e pH 7,00. Deve-se ressaltar que todos os resultados para a permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação corresponderam às condições de 75% de umidade relativa e 25°C.

4.2 - Filme Padrão

4.2.1 – Caracterização do filme protéico

A partir da melhor formulação encontrada para filmes protéicos a base de soro de leite (6,5% de proteína, 3,0% de plastificante (glicerol) e pH 7,0), concluída a partir do planejamento experimental, e denominada de filme padrão, os filmes foram obtidos e caracterizados quanto ao teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação, os resultados e seus respectivos desvios padrão estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Caracterização dos filmes protéicos a base de soro de leite.

Características do filme padrão	Valores obtidos ¹
Teor de proteína	57,10±1,26%
Teor de umidade	16,16±0,41%
Solubilidade protéica	0,7415±0,0165%
Permeabilidade ao vapor d'água	0,3023±0,0134 gmm/hm ² kPa
Tensão na ruptura	2,5558±0,1983 MPa
Elongação	68,04±5,23%
Espessura média	0,0851±0,0055 mm

¹ - média±desvio padrão

4.2.2 – Isotermas de sorção

Através das isotermas de sorção, obtêm-se informações do teor de umidade de equilíbrio em filmes protéicos em função da umidade relativa (Kim & Ustunol, 2001b). As isotermas de adsorção ou curvas de equilíbrio dos filmes protéicos a base de soro de leite foram determinadas através do método estático e direto, baseado no Projeto COST 90 (Jowitt et al., 1983). As amostras foram acondicionadas em potes contendo diferentes soluções salinas saturadas, sem abri-los durante o período equivalente ao tempo de equilíbrio. Este foi previamente determinado, nas diferentes condições de umidade relativa (obtidas através de soluções salinas saturadas) e para cada temperatura trabalhada (10°, 25° e 35°C). Foi feita triplicata para cada umidade relativa, sendo que o valor da umidade de equilíbrio das amostras (X_{bs}) é a média das três medidas, e o valor de atividade de água corresponde ao encontrado na literatura para cada solução salina trabalhada. Na Tabela 18 estão apresentados os valores de umidade de equilíbrio e da atividade de água correspondente, para cada temperatura.

As temperaturas escolhidas neste estudo foram baseadas na aproximação das condições reais de armazenamento de embalagens, sob refrigeração (10°C), temperatura ambiente (25°C) e temperatura mais elevada, característica do verão em países tropicais (35°C). As amostras acondicionadas em solução saturada de sulfato de cobre (CuSO₄, umidade relativa aproximadamente 95%) em todas as temperaturas, e em solução saturada de BaCl₂ na temperatura de 10°C, tenderam a deteriorar-se antes de atingirem o equilíbrio.

Tabela 18: Teor de umidade de equilíbrio dos filmes protéicos a base de soro de leite sob diferentes valores de umidade relativa.

Sais	T=10°C		T=25°C		T=35°C	
	a _w	X _{bs} (kg/kg)	a _w	X _{bs} (kg/kg)	a _w	X _{bs} (kg/kg)
LiCl	0,1284	0,1281	0,1105	0,1278	0,1087	0,1234
MgCl ₂	0,3352	0,1825	0,3300	0,1765	0,3200	0,1753
K ₂ CO ₃	0,4549	0,2078	0,4430	0,2056	0,4317	0,2033
MgNO ₃	0,5720	0,2624	0,5286	0,2356	0,5157	0,2114
NaBr	0,6215	0,2874	0,5770	0,2588	0,5455	0,2484
NaCl	0,7565	0,4343	0,7528	0,3887	0,7511	0,3829
KCl	0,8638	0,6703	0,8426	0,5551	0,8295	0,5331
BaCl ₂	0,9153	*	0,9019	0,7271	0,8940	0,7157

*-amostra deteriorada

Os modelos matemáticos utilizados para fazer os ajustes nos dados experimentais de equilíbrio dos filmes protéicos, em cada temperatura, foram as equações de GAB, BET e Halsey. O ajuste foi feito com o auxílio de um programa computacional Statistica version 5.0, utilizando um segmento de regressão não-linear. A avaliação foi baseada no coeficiente de regressão (R), porcentagem de confiança (P), calculados pelo programa para cada equação e condição de temperatura, e também por valores de erro (E), que correspondem ao módulo de desvio da média relativa, considerando que para valores menores que 5,0%, o ajuste pode ser considerado excelente (Lomauro et al., 1985). Estes parâmetros estão apresentados na Tabela 19, concluindo que a equação de GAB foi o melhor modelo para ajustar os dados de filmes protéicos a base de soro de leite, seguida da equação de Halsey.

Tabela 19: Valores dos coeficientes de correlação (R^2), porcentagem de confiança (P) e erro (E) obtidos através do ajuste dos modelos matemáticos das isotermas de adsorção.

T (°C)	Modelo	R	P (%)	E (%)
10	GAB	0,9996	99,926	1,5984
	BET	0,9815	96,341	11,4489
	Halsey	0,9984	99,675	4,8362
25	GAB	0,9998	99,947	1,1796
	BET	0,9467	89,612	25,4852
	Halsey	0,9989	99,787	2,8295
35	GAB	0,9989	99,774	3,7759
	BET	0,9628	92,705	21,4372
	Halsey	0,9980	99,599	5,5367

A Figura 10 ilustra os dados experimentais de equilíbrio na temperatura de 25°C, ajustados pelas equações de GAB, BET e Halsey, observando o melhor ajuste representado pela equação de GAB, seguida pela equação de Halsey.

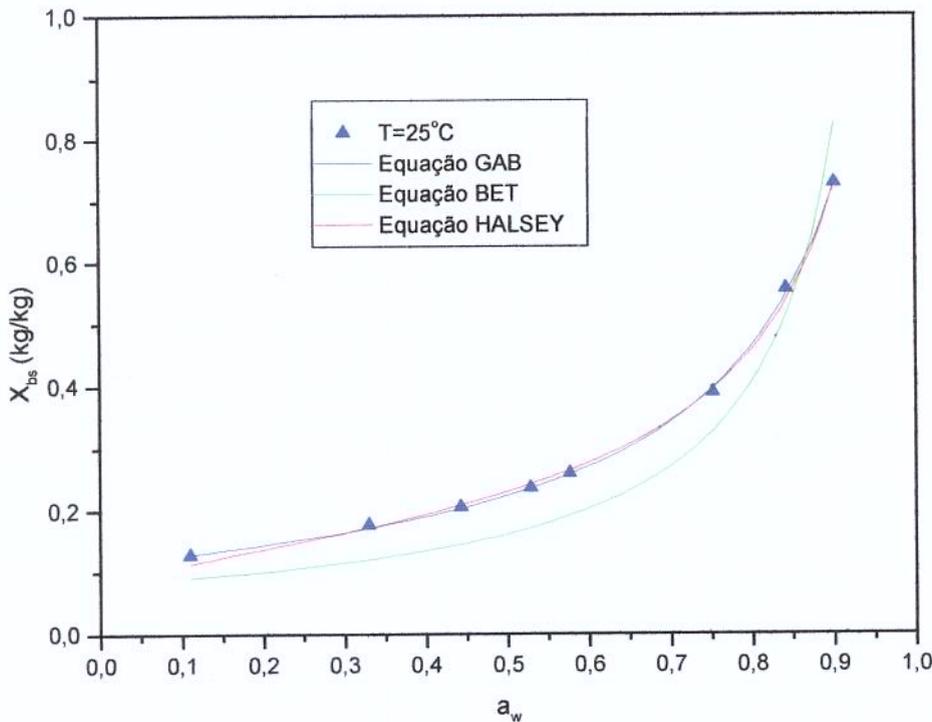


Figura 10: Isotermas de adsorção de filmes protéicos a base de soro de leite, ajustadas pelas equações de GAB, BET e Halsey na temperatura de 25°C.

A equação de GAB foi o modelo que também melhor representou as isotermas de sorção de filmes de isolado protéico de soro de leite (Coupland et al., 2000), de gelatina (Gontard et al., 1993; Lim et al., 1999), de glúten de trigo e zeína de milho (Gennadios & Weller, 1994); de metil- e etilcelulose (Cruz et al., 2001), e filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite (Kim & Ustunol, 2001b).

Os valores dos parâmetros da equação de GAB (X_m , C e K) para cada condição de temperatura, calculados pelo programa estatístico através do ajuste da equação, estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Parâmetros (X_m , C e K) da equação de GAB calculados pelo ajuste das isotermas de adsorção em diferentes condições de temperatura.

T (°C)	X_m	C	K
10	0,1215	105,2189	0,9486
25	0,1212	191,0668	0,9245
35	0,1179	217,9000	0,9348

A umidade na monocamada (X_m) decresceu com o aumento da temperatura, ao contrário da constante de Guggenheim (C_G) e o fator de correção K que não apresentaram proporcionalidade com a temperatura. Cruz et al. (2001) obtiveram comportamento semelhante do valor de monocamada em filmes de etilcelulose. As moléculas de água na monocamada correspondem a primeira camada adsorvida ao redor da proteína e estão ligadas através de pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo (Schnepf, 1989), geralmente estão relacionadas a valores de atividade de água entre 0,0 e 0,3.

As isotermas de adsorção dos filmes protéicos nas temperaturas de 10°, 25° e 35°C, ajustadas pela equação de GAB, podem ser analisadas na Figura 11. As curvas de equilíbrio apresentaram um comportamento típico de polímeros sensíveis ao vapor d'água, onde se observa uma maior quantidade de umidade adsorvida pelo filme para valores de a_w acima de 0,70, ou seja, ocorre um maior ganho de umidade nos filmes em condições de $a_w \geq 0,70$, e em baixos valores de umidade relativa, somente uma pequena quantidade de água foi adsorvida pelo filme. Esta característica está diretamente

relacionada com a permeabilidade ao vapor d'água, onde o intumescimento do filme promove uma mudança na microestrutura da matriz protéica que permite um aumento na adsorção de umidade e no fluxo de permeante.

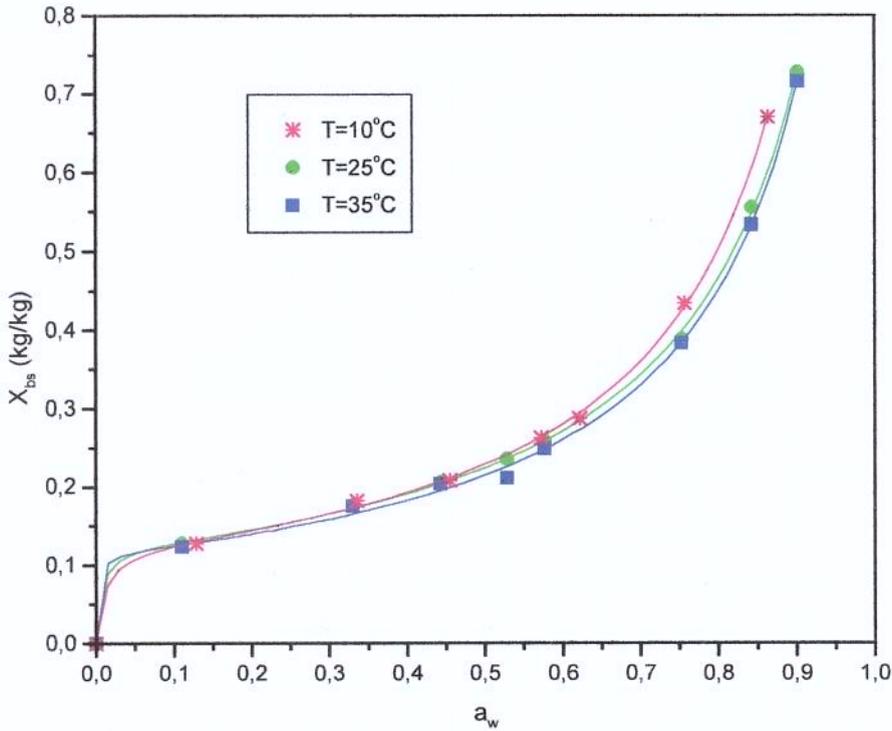


Figura 11: Isotermas de adsorção de filmes protéicos a base de soro de leite, em diferentes temperaturas, ajustadas pela equação de GAB.

Segundo Kinsella (1984), na região $0,30 < a_w < 0,90$, multicamadas são formadas acima da camada vicinal; abaixo de $a_w = 0,30$, a água é adsorvida primeiramente pelos componentes macromoleculares. Esta tendência foi verificada também para filmes de isolado protéico de soro de leite (Coupland et al., 2000), de gelatina (Gontard et al., 1993), de proteína de amendoim (Jangchud & Chinnan, 1999), de metilcelulose (Chinnan & Park, 1995), de glúten de trigo (Gontard et al., 1993) e metil- e etilcelulose (Cruz et al., 2001).

As isotermas de adsorção apresentam uma forma sigmoidal, do tipo II, segundo a classificação de Brunauer. Este tipo de curva é característica da maioria dos produtos alimentícios (Fennema, 1985), onde reflete um aumento progressivo da quantidade de

água associada à proteína, quando esta foi exposta à alta umidade relativa (Kinsella, 1984). Wiles et al. (2000) obtiveram também isotermas de adsorção de filmes a base de quitosana na forma sigmoideal, assim como Hermansson (1977) para concentrado protéico de soro de leite.

Os componentes hidrofílicos (proteína e glicerol) são responsáveis pela afinidade da água pelo filme, sendo uma característica importante segundo Morillon et al. (2000), pois em alta umidade relativa, pode-se provocar a hidratação dos filmes. A ligação da água na matriz protéica depende da composição de proteína, estrutura, polaridade superficial, topografia, porosidade, pH, presença de sais, força iônica e temperatura (Kinsella, 1984).

Para valores altos de umidade relativa, o ganho de umidade aumentou sob a forma exponencial podendo estar associado a um intumescimento dos filmes. Este fenômeno promove uma mudança na conformação da microestrutura do filme, que aumenta a adsorção de água e abre a matriz polimérica permitindo um aumento no fluxo de permeante. Este fenômeno aumenta a solubilidade e a permeabilidade ao vapor d'água do filme, onde o vapor d'água atua como plastificante na matriz filmogênica (Wiles et al., 2000). A hidratação de filmes protéicos inicia com os grupos carregados, seguida dos grupos polares e finalmente pelos resíduos polares envolvidos em ligações peptídicas e estruturas secundárias (Poole & Finney, 1983).

A isoterma de adsorção a 10°C apresentou maior diferença em relação às isotermas de 25° e 35°C. As isotermas de 25° e 35° apresentaram pouca diferença entre si, acentuando na faixa de a_w entre 0,4 e 0,85. Para a mais alta temperatura, menos umidade foi absorvida para um valor fixo de atividade de água. A temperatura influencia a mobilidade das moléculas de água e o equilíbrio dinâmico entre a fase vapor e adsorvida (Kapsalis, 1987). Segundo a equação de Clausius-Clapeyron, a quantidade de umidade adsorvida em cada atividade de água deve decrescer com o aumento da temperatura, confirmando a tendência obtida nas isotermas de adsorção dos filmes protéicos a base de soro de leite.

As propriedades de barreira ao vapor d'água e mecânicas de filmes protéicos estão diretamente relacionadas com as condições de atividade de água e temperatura (Gontard et al., 1993). Em altos valores de a_w , ocorre um intumescimento na matriz protéica, favorecendo a difusão de moléculas de água e então reduzindo a eficiência da propriedade de barreira ao vapor d'água. Assim como, filmes com alto teor de umidade perdem sua resistência a tração.

4.2.3 - Calor isostérico de sorção

O estudo do efeito da temperatura nas isotermas de sorção permitiu a determinação do calor de sorção em diferentes valores de umidade. O excesso de calor isostérico de sorção (q_{st}) em função da umidade do filme (X_{bs}) foi determinado a partir das isotermas de adsorção dos filmes protéicos ajustadas pela equação de GAB em diferentes temperaturas. Este estudo analisa parâmetros energéticos da sorção de água no filme, fornecendo dados sobre o estado da água no produto, ou seja, o calor isostérico de sorção representa a quantidade de energia necessária para evaporar a água adsorvida na fase sólida.

O cálculo de q_{st} é feito através da equação de Clausius-Clapeyron (Eq.8), que relaciona a mudança de atividade de água com a temperatura. Foi feita uma regressão linear dos dados do logaritmo neperiano das atividades de água *versus* o inverso da temperatura, a diferentes umidades, como pode ser observado na Figura 12. O valor do calor de sorção corresponde ao coeficiente angular de cada reta, multiplicada pela constante universal dos gases ($R=0,46188$ kJ/kg).

Os resultados obtidos do calor de sorção dos filmes protéicos a base de soro de leite em função do teor de umidade estão apresentados na Tabela 21, indicando uma redução proporcional da energia em função do teor de umidade dos filmes protéicos de soro de leite. Em altos teores de umidade o q_{st} tende a zero indicando que se aproxima do calor de vaporização da água.

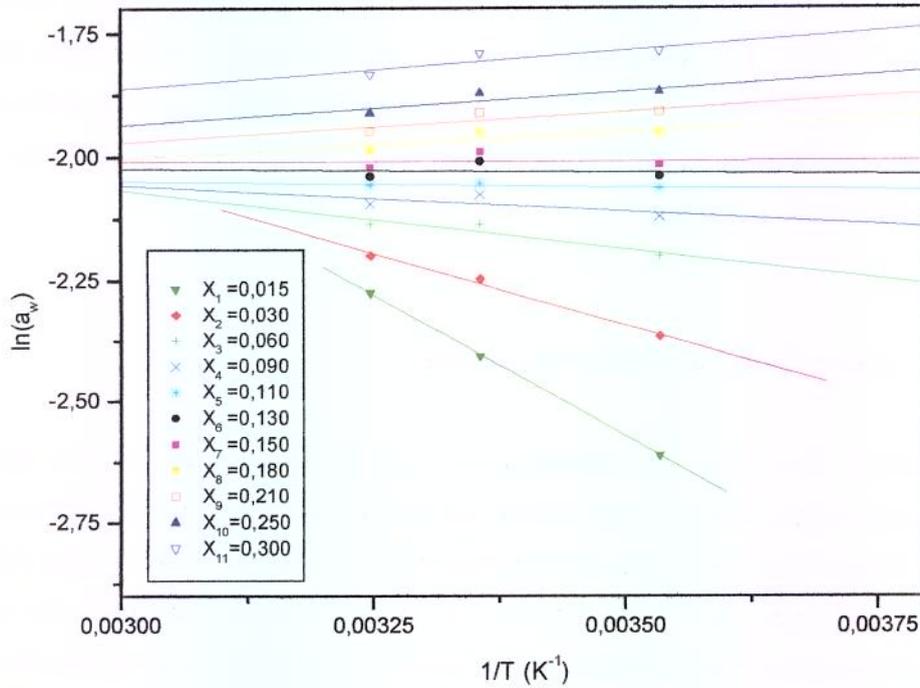


Figura 12: Relação entre a atividade de água e temperatura absoluta, baseada na equação de Clausius-Clapeyron, para filmes protéicos a base de soro de leite.

Tabela 21: Valores calculados do calor de sorção dos filmes protéicos a base de soro de leite, para diferentes teores de umidade.

X_{bs} (kg/kg)	q_{st} (kJ/kg)
0,015	538,82
0,030	273,49
0,060	110,55
0,090	49,56
0,110	11,93
0,130	7,67
0,150	-0,94
0,180	-49,61
0,210	-57,26
0,250	-62,09
0,300	-64,90

Através da Figura 13 pode-se analisar a relação entre o excesso de calor de sorção com o teor de umidade dos filmes protéicos. Observa-se que o calor de sorção diminuiu com o aumento do teor de umidade. Esta proporcionalidade inversa de q_{st} e X_{bs} é resultado da sorção da água pela matriz polimérica ocorrendo inicialmente nos sítios disponíveis, mais ativos, sendo o ponto de maior interação de energia. E ao longo do processo, a disponibilidade de sítios ativos decresce (Iglesias & Chirife, 1976a; Maskan & Gögüs, 1998). Ayranci (1996) obteve uma curva semelhante de calor de sorção em função do teor de umidade para filmes a base de metilcelulose.

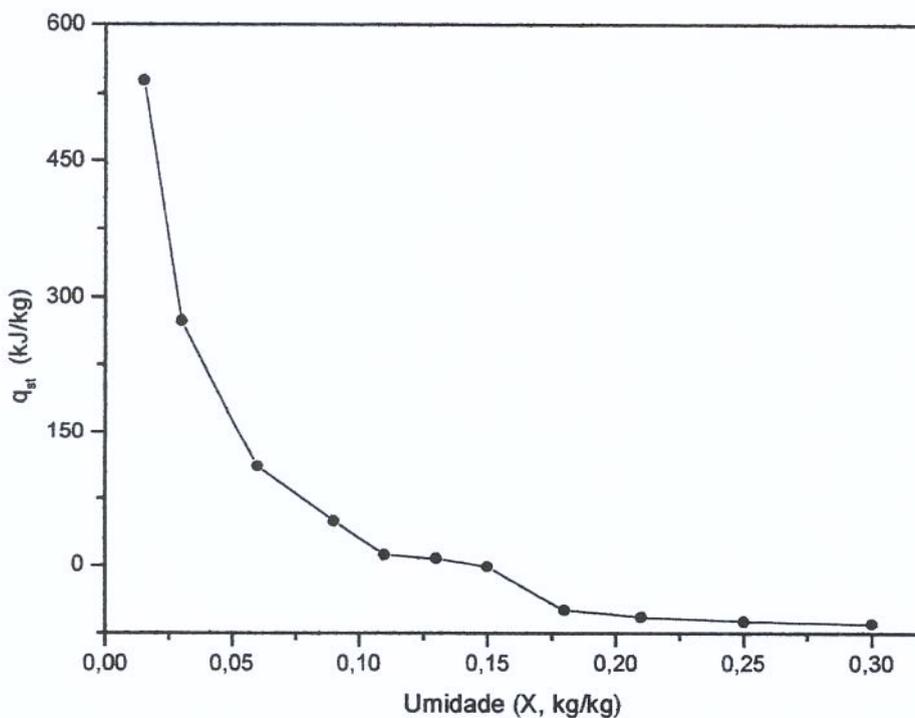


Figura 13: Influência do teor de umidade no calor de sorção dos filmes protéicos a base de soro de leite.

4.2.4 - Conclusões parciais

As isotermas de adsorção dos filmes protéicos a base de soro de leite permitem a avaliação do comportamento em diferentes condições de umidade relativa e temperatura, sendo um fator importante na aplicação como embalagem.

A equação de GAB foi o modelo que melhor representou os dados de adsorção dos filmes protéicos a base de soro de leite, apresentando uma forma sigmoidal, do tipo II, considerada a forma característica de diversos alimentos. A influência da temperatura foi verificada entre as curvas de adsorção dos filmes protéicos a base de soro de leite. Em temperatura mais alta, a adsorção de vapor d'água pelos filmes é menor, em um valor fixo de atividade de água. O calor de sorção dos filmes protéicos diminui com o aumento do teor de umidade.

As amostras submetidas a valores altos de umidade relativa (solução saturada de CuSO_4 e BaCl_2) deterioraram antes de atingir o equilíbrio, sendo então descartadas na análise dos dados e indicando a instabilidade dos filmes protéicos nestas condições.

CAPÍTULO 5

5- Filmes Multicomponentes – Filmes Emulsionados

A eficiência de barreira à umidade é requerida em filmes quando se deseja retardar a desidratação de produtos alimentícios frescos, como frutas, vegetais e carnes, ou para evitar a hidratação de produtos com baixo teor de umidade. Os filmes protéicos de soro de leite apresentaram propriedade de barreira à umidade moderada, devido à característica hidrofílica de seus componentes, a proteína e o plastificante (glicerol). Nesta etapa, a adição de um composto hidrofóbico (ácido esteárico) foi estudada, com o objetivo de verificar a redução da permeabilidade ao vapor d'água dos filmes, mas com o cuidado de não perder propriedades mecânicas importantes, pois filmes lipídicos tendem a ser quebradiços e com baixa flexibilidade.

A partir da formulação padrão (6,50% proteína e 3,00% glicerol) foram adicionados diferentes concentrações de ácido esteárico. Através de ensaios preliminares, a concentração limite de ácido graxo foi definida, onde a formação de filmes com adição de 0,0 a 5,0% de ácido esteárico foi avaliada, verificando que filmes com concentrações iguais e superiores a 1,25% eram difíceis de retirar das placas e impossíveis de manuseá-los, padronizando como 1,00% a concentração limite superior para a adição de ácido esteárico. Os filmes emulsionados à base de soro de leite foram obtidos em pH ácido (5,0 e 6,0), pH neutro (7,0) e pH básico (9,0), na faixa de concentração de ácido esteárico correspondente a 0,00; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00%. As principais características visuais e táteis observadas nos filmes, uma vez formados, em função do pH foram:

- pH 5,0 e 6,0: filmes contendo ácido esteárico apresentaram uma solução muito viscosa, ocorrendo a incorporação de ar ao ajustar o pH da solução. Com dificuldade, as soluções foram dispersas em suportes planos, formando filmes não homogêneos, de difícil manuseio, com presença de partículas insolúveis e bolhas de ar. Estes valores de pH foram descartados, uma vez que a fragilidade e o difícil manuseio, presença de falhas (poros, fissuras) não permitiram a medida das propriedades dos filmes.
- pH 7,0: a flexibilidade dos filmes contendo ácido graxo diminuiu quando comparados com o filme referência (0,00% ácido esteárico), com coloração levemente amarela e baixa opacidade, e ausência de bolhas de ar. Filmes contendo 0,75 e 1,00% de ácido esteárico apresentaram partículas brancas insolúveis (aumentando proporcionalmente com o aumento da concentração de ácido esteárico).
- pH 9,0: os filmes apresentaram flexibilidade alta (manuseio), opacidade baixa, não homogêneos, ausência de bolhas de ar e apresentavam partículas brancas insolúveis, aumentando proporcionalmente com a concentração de ácido esteárico adicionada.

Não foi possível obter filmes protéicos de soro de leite em pH ácido, onde em pH próximo ao ponto isoelétrico a carga das proteínas aproxima-se de zero, tornando as forças de repulsão eletrostáticas fracas, aumentando as interações atrativas entre as proteínas, precipitando-as e então aumentando a viscosidade da solução.

O efeito do pH reflete a diminuição da capacidade de emulsificação e de formar filme, devido a mudanças conformacionais nas proteínas do soro de leite (Shimizu et al., 1985). Pérez-Gago & Krochta (1999) obtiveram filmes a base de isolado protéico de soro de leite e cera de abelha, em pH 4,0-5,0, quebradiços e com defeitos, caracterizados por uma maior permeabilidade ao vapor d'água em relação ao pH neutro e básico. E atribuíram o aumento da viscosidade da solução filmogênica em pH ácido, a uma maior agregação das proteínas, impedindo a interação proteína-proteína na matriz filmogênica que reduz a mobilidade e a interligação das partículas lipídicas com a cadeia protéica.

A opacidade é consequência da presença dos lipídios na formulação dos filmes. A mesma característica foi observada por Yang & Paulson (2000a) em filmes de gelatina com adição de ácido palmítico e esteárico ou cera de abelha; por Gallo et al. (2000) em filmes de metilcelulose com alcanos; por Debeaufort & Voilley (1995) em filmes de metilcelulose com adição de triglicerídios ou alcanos; por Gontard et al. (1995), em filmes emulsificados de glúten de trigo.

A quantidade de partículas brancas insolúveis presentes nos filmes protéicos foi proporcional à concentração de ácido esteárico e, pode estar associada à separação de fases (lipídio e proteína) durante o processo de secagem. Este efeito foi observado nas concentrações de 0,75 e 1,00% de ácido esteárico, podendo considerar os filmes contendo 0,25 e 0,50% como emulsões estáveis.

A partir das observações feitas para cada pH, concluiu-se que as condições de pH 7,0 e 9,0 permitiram a caracterização (teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica) e avaliação (permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e alongação) dos filmes emulsionados, variando a concentração de ácido esteárico adicionado (faixa de 0,0-1,0%). O teor de proteína e umidade em função da concentração de ácido esteárico adicionado na formulação filmogênica, estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Teor de proteína e de umidade em filmes emulsionados em pH 7,0 e 9,0.

Ácido esteárico (%)	pH 7,0		pH 9,0	
	Proteína ¹ (%)	X (%)	Proteína ¹ (%)	X (%)
0,00	57,93	18,06	55,73	18,38
0,25	55,68	18,55	52,45	18,53
0,50	54,08	18,57	50,57	18,26
0,75	53,71	17,69	50,23	18,01
1,00	50,97	18,33	49,24	18,51

1 - teor de proteína em 0,1g de filme

Os filmes emulsionados de proteína de soro de leite obtidos em pH 7,0 e 9,0 foram avaliados quanto à solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes emulsionados, descritos nos próximos itens.

quantidade de lipídio adicionada deve ser ideal para reduzir a permeabilidade ao vapor d'água e manter um bom manuseio dos filmes. Os valores de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos a base de soro de leite em função da concentração de ácido esteárico, nos pH 7,0 e 9,0 podem ser analisados na Tabela 24 e Figura 15. As espessuras dos filmes foram mantidas em $0,099 \pm 0,010$ mm.

Tabela 24: Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.

Cp (%)	Cg (%)	Ácido esteárico (%)	Permeabilidade ao vapor d'água (gmm/hm ² kPa) ¹	
			pH 7,0	pH 9,0
6,5	3,0	0,00	0,3084 ± 0,0062 ^a	0,3018 ± 0,0146 ^a
		0,25	0,2701 ± 0,0021 ^b	0,2696 ± 0,0001 ^b
		0,50	0,2680 ± 0,0006 ^b	0,2561 ± 0,0045 ^{cd}
		0,75	0,2590 ± 0,0006 ^c	0,2490 ± 0,0064 ^d
		1,00	0,2506 ± 0,0010 ^d	0,2328 ± 0,0009 ^e

a, b, c, d, e – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média ± desvio padrão

O aumento da hidrofobicidade, representada pela concentração de ácido esteárico, provocou a redução na permeabilidade ao vapor d'água, com valores menores para filmes obtidos em pH básico (9,0) do que em pH neutro. Em pH 7,0, a permeabilidade ao vapor d'água reduziu em 12,68%, quando se aumentou a concentração de ácido esteárico de 0,00% para 1,00%, e nas concentrações de 0,50 e 0,75% de ácido esteárico, os valores de permeabilidade não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A presença de ácido esteárico reduziu a mobilidade protéica, que formou um filme viscoelástico na interface lipídio-água, diminuindo a difusividade da água através da proteína interfacial, promovendo um menor valor de permeabilidade ao vapor d'água (McHugh & Krochta, 1994c).

Em pH 9,0, houve uma maior redução na permeabilidade quando comparado com os filmes obtidos em pH 7,0, ou seja, o aumento da concentração de ácido esteárico de 0,0 para 1,00%, provocou uma diminuição em 17,04% da condição inicial, formando uma

matriz filmogênica menos hidrofílica em pH alcalino. Em pH maior que 8,0, a reatividade dos grupos SH aumenta rapidamente, favorecendo a reação de troca dissulfídica, e conseqüentemente grupos hidrofóbicos são expostos, podendo provocar agregação (Kella et al., 1989). Segundo Kinsella (1984), a formação de uma rede polimérica é influenciada principalmente por dois fatores, o pH e a presença de grupos tiol.

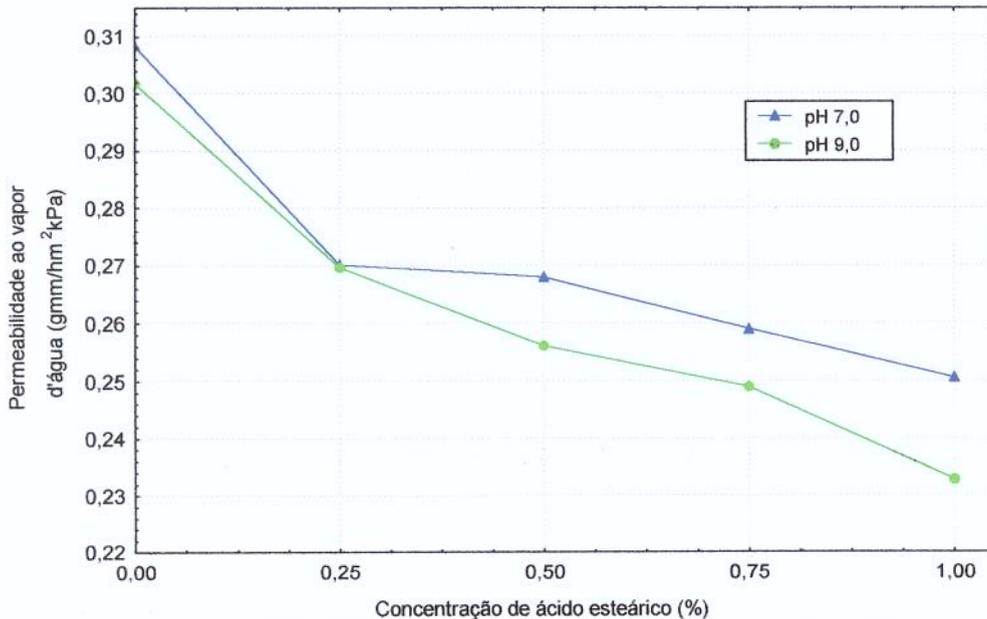


Figura 15: Permeabilidade ao vapor d'água de filmes emulsionados a base de proteína do soro de leite com ácido esteárico.

A adição de 0,25% de ácido esteárico foi suficiente para provocar diferença significativa na permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos de soro de leite em pH neutro e básico. Mas, em pH básico a redução foi mais acentuada, indicando a formação de uma matriz mais homogênea, com maior número de ligações entre as cadeias de proteínas, englobando mais moléculas de ácido graxo, diminuindo a afinidade dos filmes com moléculas de água, explicando a menor solubilidade protéica e permeabilidade ao vapor d'água.

Estes resultados confirmam as conclusões obtidas por Pérez-Gago & Krochta (1999) para filmes emulsionados a base de isolado protéico de soro de leite com cera de abelha; por Shellhammer & Krochta (1997) em filmes a base de proteínas de soro de leite

com adição de diferentes concentrações de lipídios; por Sapru & Labuza (1994) em filmes compostos por metilcelulose e ácido esteárico; por Avena-Bustillos & Krochta (1993) em filmes de caseinato de sódio com monoglicerídios acetilado, cera de abelha ou ácido esteárico; por Ayranci & Tune (2001) em filmes de metilcelulose com ácido esteárico, ácido palmítico e ácido láurico.

A transferência de vapor d'água através de filmes emulsionados está diretamente relacionada com o tamanho da cadeia e grau de saturação dos ácidos graxos (Kemper & Fennema, 1984). Segundo McHugh & Krochta (1994e) e Shellhammer & Krochta (1997), a redução da permeabilidade ao vapor d'água em filmes compostos por concentrado protéico de soro de leite e cera de abelha estava diretamente relacionada com o tamanho da partícula lipídica, onde o decréscimo no tamanho promoveu uma melhor interação da proteína com a cera.

5.3 - Tensão na Ruptura e Porcentagem de Elongação

As propriedades mecânicas dos filmes dependem da capacidade de obter uma matriz resistente e da formação de ligações moleculares entre as cadeias protéicas e lipídicas. A tensão na ruptura é a máxima força de tração que o filme pode sustentar antes de romper, e está relacionada com a ordem de grandeza da energia nas ligações intermoleculares presentes na matriz filmogênica (Robertson, 1993). A aplicação dos filmes como embalagem requer características mecânicas como a capacidade de estender e tensão mecânica para resistir às forças externas e manter sua integridade (Yang & Paulson, 2000b). A Tabela 25 apresenta os dados de tensão na ruptura dos filmes emulsionados em pH 7,0 e 9,0.

A adição de lipídio enfraqueceu os filmes protéicos, ou seja, quanto maior a concentração de ácido graxo, menor a tensão na ruptura encontrada, isto confirma que a fase protéica apresenta maior tensão na ruptura que a fase lipídica, e o aumento da concentração da fase lipídica provocou a redução da tensão na ruptura da fase protéica. Em pH 7,0, os filmes emulsionados reduziram a tensão na ruptura em 16,89% da condição inicial, quando se aumentou de 0,0 para 1,0% de ácido esteárico; e a partir da

Figura 16, observou-se uma maior tensão na ruptura dos filmes nesta condição, quando comparado com os obtidos em pH 9,0, ou seja, filmes protéicos de soro de leite mais resistentes foram obtidos em pH neutro. O mesmo foi observado em filmes protéicos a base de soro de leite emulsionados com diferentes lipídios, como cera de abelha e carnaúba (Shellhammer & Krochta, 1997; Banerjee & Chen, 1995), em filmes de clara de ovo (Handa et al., 1999b).

Tabela 25: Tensão na ruptura de filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.

Cp (%)	Cg (%)	Ácido esteárico (%)	Tensão na ruptura (MPa) ¹	
			pH 7,0	pH 9,0
6,50	3,00	0,00	2,4867 ± 0,0702 ^a	2,0100 ± 0,0917 ^c
		0,25	2,3033 ± 0,0252 ^b	1,9733 ± 0,0551 ^{cd}
		0,50	2,2500 ± 0,0100 ^b	1,8200 ± 0,0200 ^{de}
		0,75	2,3267 ± 0,0404 ^b	1,7933 ± 0,0764 ^e
		1,00	2,0667 ± 0,0513 ^c	1,7867 ± 0,0252 ^e

^{a, b, c, d, e} – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).
¹ - média±desvio padrão

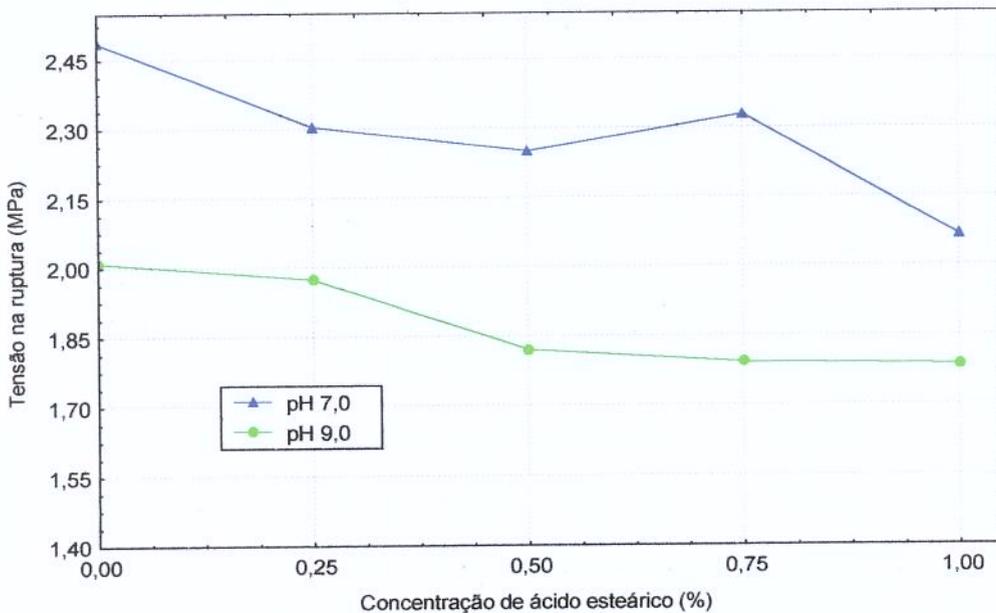


Figura 16: Tensão na ruptura de filmes emulsionados compostos por proteína do soro de leite e ácido esteárico em pH 7,0 e 9,0.

A diminuição da tensão na ruptura com o aumento da concentração de ácido esteárico foi associada por Yang & Paulson (2000a), aos grupos carboxil presentes nas moléculas de ácido esteárico, que competem com as moléculas de proteína, reduzindo as interações entre os polímeros e conseqüentemente enfraquecendo a tensão mecânica do filme.

A homogeneização do lipídio na solução protéica é uma etapa muito importante, pois o diâmetro da partícula lipídica e sua distribuição homogênea na matriz polimérica estão diretamente relacionados com a tensão na ruptura e a porcentagem de alongação, onde quanto menor o diâmetro e mais homogênea a distribuição, formam-se filmes com uma matriz mais contínua, regular e estável (Debeaufort & Voilley, 1995).

A alongação corresponde à máxima variação no comprimento da amostra antes da quebra ou ruptura, mede a capacidade de esticar. Os resultados da porcentagem de alongação dos filmes emulsionados em pH 7,0 e 9,0 estão apresentados na Tabela 26 em função da concentração de ácido esteárico adicionada. A porcentagem de alongação decresceu com o aumento da concentração de ácido esteárico, indicando uma perda na propriedade elástica dos filmes. Filmes a base de lipídio caracterizam-se por baixas propriedades mecânicas, assim quanto mais ácido graxo foi adicionado na solução filmogênica, maior foi a perda na capacidade de estender do filme.

Tabela 26: Porcentagem de alongação de filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.

Cp (%)	Cg (%)	Ácido esteárico (%)	Alongação (%) ¹	
			pH 7,0	pH 9,0
6,50	3,00	0,00	67,46 ± 1,98 ^a	65,15 ± 1,42 ^a
		0,25	48,20 ± 0,46 ^{cd}	55,88 ± 1,41 ^b
		0,50	44,80 ± 0,28 ^d	50,48 ± 0,75 ^c
		0,75	25,90 ± 1,39 ^f	31,35 ± 0,24 ^e
		1,00	11,19 ± 0,07 ^g	29,28 ± 0,06 ^{ef}

a, b, c, d, e, f, g – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média ± desvio padrão

Em pH 7,0, a redução na alongação foi mais acentuada, onde a diferença de 0,0 a 1,0% de lipídio adicionado provocou perda na ordem de 56,27% correspondendo a uma redução em 83,41% da condição inicial e em pH 9,0, na ordem de 35,87%, correspondendo à redução de 55,06% da condição inicial. Este fenômeno pode ser explicado pela formação de uma matriz filmogênica com menor continuidade, pela presença de glóbulos lipídicos.

O pH neutro das soluções emulsionadas de proteína de soro de leite favoreceu a formação de uma matriz filmogênica mais resistente e menos elástica quando comparada aos filmes obtidos em pH alcalino (Figura 17), podendo concluir que uma matriz mais rígida (maior tração) foi obtida, mas com menor flexibilidade, facilitando o rompimento do filme ao aplicar uma tensão. Valores de tensão menores permitiram uma maior capacidade de os filmes esticarem antes de romper. A escolha da melhor formulação está diretamente relacionada com as condições e tipo de aplicação dos filmes protéicos.

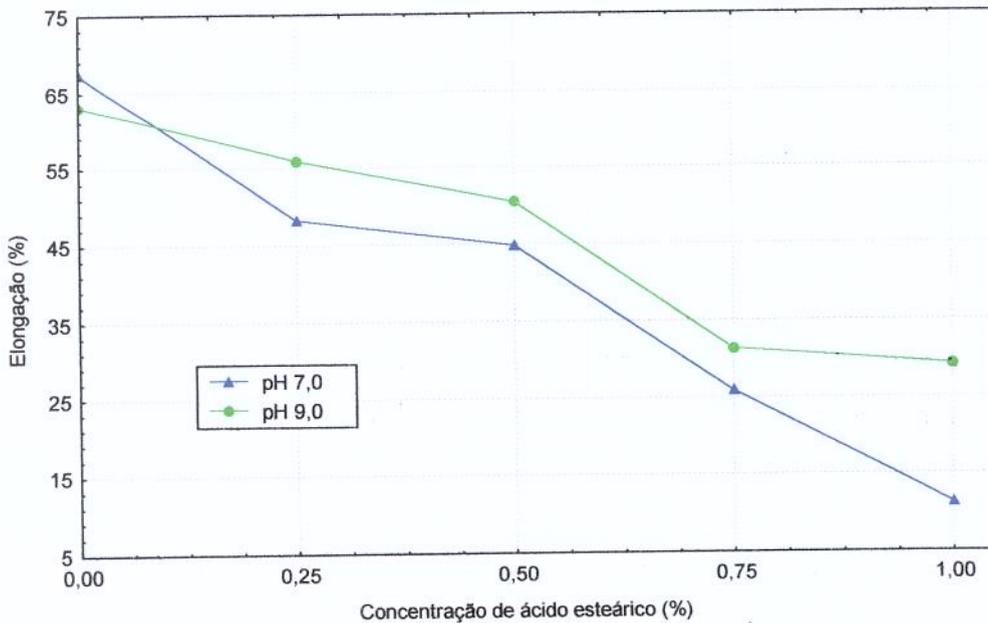


Figura 17: Porcentagem de alongação de filmes emulsionados a base de proteínas do soro de leite em pH 7,0 e 9,0.

Nos filmes contendo 0,75 e 1,00% de ácido esteárico, a baixa porcentagem de alongação encontrada foi influenciada pela presença de partículas brancas insolúveis (lipídios), atuando como pontos mais fracos (falhas) e fáceis de romper, indicando a formação de uma matriz com menor homogeneidade. Esta tendência também foi verificada por Yang & Paulson (2000a) em filmes a base de gelana com ácido esteárico e palmítico ou cera de abelha, e por Debeaufort & Voilley (1995) em filmes de metilcelulose com triglicerídios e alcanos. Handa et al. (1999a) afirmaram que a elasticidade dos filmes protéicos emulsionados diminuiu com a baixa integridade estrutural da matriz.

É importante a formação de filmes emulsionados homogêneos para garantir suas propriedades mecânicas, onde qualquer falha (presença de partículas insolúveis) pode ser considerada como o ponto frágil de quebra. O efeito negativo dos lipídios nas propriedades mecânicas dos filmes pode ser resultado da substituição parcial dos polímeros pelos lipídios na matriz filmogênica, onde interações lipídio-lipídio (moléculas não polares) e lipídio-proteína (moléculas polares) apresentam menor energia que a ligação proteína-proteína.

5.4 - Conclusões Parciais

A adição de ácido esteárico na formulação de filmes protéicos de soro de leite provocou uma redução na solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação. Ou seja, melhorou as propriedades de barreira, mas reduziu as mecânicas, tornando os filmes mais fáceis de quebrar e menos elásticos. Estas tendências acentuavam com o aumento da concentração de lipídio.

Não foi possível caracterizar os filmes emulsionados de proteínas de soro de leite em pH ácido, devido ao aumento da viscosidade da solução filmogênica, promovendo a incorporação de bolhas e a formação de filmes com poros, fissuras e manuseio difícil. Ou seja, valores baixos de pH, próximo ao ponto isoelétrico, aumentaram a força de atração entre as cadeias de proteínas, formando agregados (precipitados), aumentando a viscosidade da solução.

Em pH básico (pH 9,0), os filmes emulsionados apresentaram uma menor solubilidade protéica e permeabilidade ao vapor d'água em relação aos filmes em pH neutro (pH 7,0), e quanto às propriedades mecânicas, a tensão na ruptura foi menor e a porcentagem de alongação maior. Assim, concluiu-se que uma melhor formação da matriz filmogênica ocorreu em pH alcalino, associado à maior reatividade do grupo SH, promovendo a formação de ligações covalentes dissulfídicas entre as cadeias protéicas. Em pH 7,0, os filmes emulsionados obtidos apresentaram resultados estatisticamente significativos, e deve-se ressaltar que dependendo da aplicação dos filmes é mais interessante trabalhar com uma formulação em pH neutro do que em básico, no que diz respeito à menor propensão de desenvolvimento microbiano.

A influência de algumas etapas no processo de obtenção da emulsão filmogênica, como a homogeneização e a deaeração foi observada em ensaios preliminares. A homogeneização está relacionada com o tamanho da partícula lipídica na solução, onde o tempo e a velocidade de homogeneização influenciaram na obtenção de uma matriz filmogênica mais homogênea e estável, estando relacionada a menores partículas lipídicas, e conseqüentemente, com propriedades de barreira mais eficiente. A deaeração promove a retirada de bolhas de ar formando filmes homogêneos, não apresentando pequenos poros, defeitos que facilitam o transporte de vapor d'água (aumento da permeabilidade ao vapor d'água) e a quebra ao aplicar uma força.

CAPÍTULO 6

6 - Difusão em Filmes Protéicos a Base de Soro de Leite

A determinação do coeficiente de difusão em filmes protéico de soro de leite consistiu em quantificar a adsorção de umidade através dos filmes, acondicionados em ambiente com umidade relativa (75%) e temperatura (25°C) controladas, através de medidas da massa de umidade adsorvida pelo filme em função do tempo, e os resultados foram comparados com a previsão da equação diferencial para difusão (2ª Lei de Fick).

As variáveis estudadas para a determinação do coeficiente de difusão de filmes protéicos de soro de leite foram: a posição em que foram acondicionados, ou seja, vertical (todas as faces do filme estão em contato com o ar ambiente) e horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo (o filme está apoiado em um suporte plano e apenas uma face do filme está em contato com o ar ambiente); e a característica hidrofílica dos filmes protéicos, através da adição de um composto hidrofóbico (ácido esteárico) na solução filmogênica. Filmes padrão, obtidos por desnaturação térmica, foram comparados com filmes emulsionados com a incorporação de 1,0% de ácido esteárico.

A interpretação do fenômeno de transporte em filmes protéicos pode ser descrita através do coeficiente de difusão, onde parâmetros estruturais da matriz influenciam o mecanismo de transporte, tais como peso molecular, ligações presentes na matriz filmogênica, volume livre, cristalinidade, polaridade, orientação, presença de aditivos, ou seja, basicamente depende do material (Peppas & Brannon-Peppas, 1994; Miller & Krochta, 1997).

O estudo das propriedades de transporte permite descrever o comportamento quando aplicados como embalagens, avaliando o transporte de umidade, aroma e gases (Miller et al., 1998). Segundo Redl et al. (1996), a qualidade do produto depende do processo difusivo de umidade, gases e outros solutos. O coeficiente de difusão depende da estrutura da matriz (peso molecular, grau de reação cruzada e ramificação do polímero, e coeficiente de expansão térmica do polímero e do solvente) e da solubilidade em água (Labuza & Hyman, 1998; Peppas, 1994).

Filmes protéicos geralmente são caracterizados por uma baixa barreira ao vapor d'água, e são considerados permeáveis ou semipermeáveis à difusão de umidade, devido à natureza hidrofílica das proteínas e plastificante. Desta forma, a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes depende da estrutura da matriz polimérica, do tipo de solvente, concentração e tipo de plastificante, adição de compostos hidrofóbicos (lipídios), presença de volume vazio, de poros e falhas na matriz protéica.

6.1 - Difusão em Filmes Padrão

O experimento de determinação do coeficiente de difusão em filmes padrão foi realizado em três posições distintas: vertical, horizontal com a face do filme voltada para cima e horizontal com a face do filme voltada para baixo, visando verificar a influência da força da gravidade no processo de adsorção de umidade dos filmes protéicos a base de soro de leite. As dimensões dos filmes protéicos foram padronizadas em 13,5 x 3,5cm, e a formulação filmogênica consistiu em 6,5% de proteína, 3,0% de plastificante (glicerol) e pH 7,0, denominada como filme padrão.

6.1.1 - Adsorção na posição vertical

Os filmes protéicos de soro de leite foram acondicionados na posição vertical, admitindo-se que todas as faces do filme estavam em contato com as condições do ar ambiente, ou seja, foi aplicada uma condição simétrica nas amostras. Primeiramente, o

filme adsorveu umidade por todas as faces, e então foi estabelecido um gradiente de concentração de umidade através da amostra.

A espessura média dos filmes protéicos foi de $L=(0,297\pm 0,001)$ mm, correspondente a seis vezes o volume aplicado para a obtenção dos filmes protéicos utilizados nas etapas anteriores. A opção de trabalhar com uma espessura maior foi para evitar a oscilação dos resultados de massa ganha, observada quando se trabalhou com espessuras finas, evidenciando as diferenças das condições de acondicionamento e de pesagem, e conseqüentemente favoreceu o processo de dessecção. Estas variações interferem diretamente no ajuste matemático para a obtenção do coeficiente de difusão.

O cálculo do coeficiente de difusão de vapor d'água foi desenvolvido através da comparação entre os dados experimentais de umidade adsorvida (massa ganha) em função do tempo de acondicionamento, e a solução da equação diferencial de difusão, segundo a Lei de Fick. Os filmes protéicos foram considerados como placas planas infinitas, ao comparar a espessura média com as dimensões da superfície (13,5 x 3,5cm). Para resolver a equação diferencial parcial de difusão, é necessário definir a condição inicial do filme e as condições de contorno (valores da concentração de umidade nas superfícies do filme durante o experimento). O teor de umidade inicial dos filmes, neste experimento correspondeu a 14,49%.

O fluxo de umidade é unidimensional (x), na direção perpendicular à superfície do filme, onde x mede a penetração da umidade no filme. A origem de x é no centro das duas superfícies do filme, sendo então as coordenadas limites $x=\pm L / 2$. A equação diferencial linear para um processo de difusão de umidade unidimensional através do filme, segundo a Lei de Fick, é dada por (Crank, 1975):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Eq. 24})$$

considerando que, D é o coeficiente de difusão (m^2/s); $C=C(x,t)$ é a concentração mássica de umidade (kg/m^3); t é o tempo de acondicionamento (s).

A condição inicial e as condições de contorno são:

$$C(x,0) = C_0 \quad (\text{Eq. 25})$$

$$C(x = \pm L/2, t) = C_s \quad (\text{Eq. 26})$$

Resolvendo a Eq.(24), através do método das séries de Fourier (CRANK, 1975), temos:

$$C(x,t) = C_0 + (C_s - C_0) \left[1 - \sum_{n=0,1,2,\dots} A_n \cos(K_n x) \exp(-D K_n^2 t) \right] \quad (\text{Eq. 27})$$

onde,

$$K_n = \frac{(2n+1)\pi}{L} \quad \text{e} \quad A_n = \frac{4(-1)^n}{LK_n}$$

A quantidade total de umidade adsorvida na placa plana após um intervalo de tempo t é dada por:

$$M(t) = S \int_{-L/2}^{+L/2} C(x,t) dx = M_0 + (M_s - M_0) \left[1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0,1,2,\dots} \frac{\exp(-D K_n^2 t)}{(2n+1)^2} \right] \quad (\text{Eq.28})$$

onde, M_0 é a massa inicial do filme, M_s é a massa no estado estacionário e S é a área superficial do filme exposto.

Para o cálculo do coeficiente de difusão, considera-se a massa normalizada de umidade adsorvida:

$$\mu(t) = \frac{(M(t) - M_0)}{(M_s - M_0)} \quad (\text{Eq.29})$$

onde, $M(t) - M_0$ é a quantidade total de vapor d'água difundida no filme no tempo t
 $M_s - M_0$ é a quantidade de vapor d'água após um tempo infinito.

Assim a série infinita que aparece na Eq.(28) fica, para a posição vertical:

$$\mu_v(t) = \left[1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0,1,2,\dots} \frac{\exp(-D K_n^2 t)}{(2n+1)^2} \right] \quad (\text{Eq.30})$$

Os resultados de massa adsorvida em função do tempo de acondicionamento para as placas na posição vertical estão apresentados na Tabela 27, onde $m_v(t)$ é a média de triplicata, e calculada pela diferença entre a massa do filme no tempo t e a massa inicial ($M(t)-M_0$); $\mu_v(t)$ é a massa normalizada média, calculada pela relação dada pela Eq.(29); e σ_μ , o desvio padrão.

Tabela 27: Massa ganha nos filmes protéicos a base de soro de leite (padrão) acondicionados na posição vertical a 25°C e 75% de umidade relativa.

Tempo (h)	$m_v(t)$ (g)	$\mu_v(t)$	σ_μ
0	0,0000	0,0000	—
4	0,1374	0,4790	0,0440
8	0,1855	0,6468	0,0091
12	0,2015	0,7026	0,0032
16	0,2086	0,7273	0,0305
28	0,2601	0,9069	0,0074
36	0,2703	0,9425	0,0022
56	0,2732	0,9526	0,0163
80	0,2868	1,0000	0,0245

O ajuste dos dados experimentais foi feito utilizando a Eq.(30) com o auxílio do programa computacional Minuit (James & Ross, 1989), considerando 100 termos da série infinita, obtendo o valor do coeficiente de difusão do filme na posição vertical:

$$D_v = (9,3 \pm 0,1) \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$

A concentração de umidade uniforme no estado estacionário, que é uma condição de contorno, é dada por:

$$C_S - C_O = \frac{(M_S - M_O)}{S L} \quad (\text{Eq.31})$$

onde, C_O corresponde à concentração de umidade inicial no filme no tempo $t=0$; C_S é a concentração de umidade na superfície do filme durante o experimento; M_S é a massa de água adsorvida no estado estacionário; M_O é a massa de água adsorvida no tempo $t=0$; S é a área do filme; L é a espessura média.

Sendo a massa de água adsorvida no estado estacionário, determinada experimentalmente, $(M_S - M_O) = 2,87 \times 10^{-4}$ kg; e a área da superfície dos filmes protéicos, $S = (13,5 \times 3,5) \times 10^{-4}$ m², tem-se o valor da concentração de umidade:

$$C_S - C_O = (2,05 \pm 0,16) \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

Na Figura 18, os dados experimentais de $\mu_v(t)$ em função do tempo foram comparados com os valores preditos pelo modelo, indicando um bom ajuste.

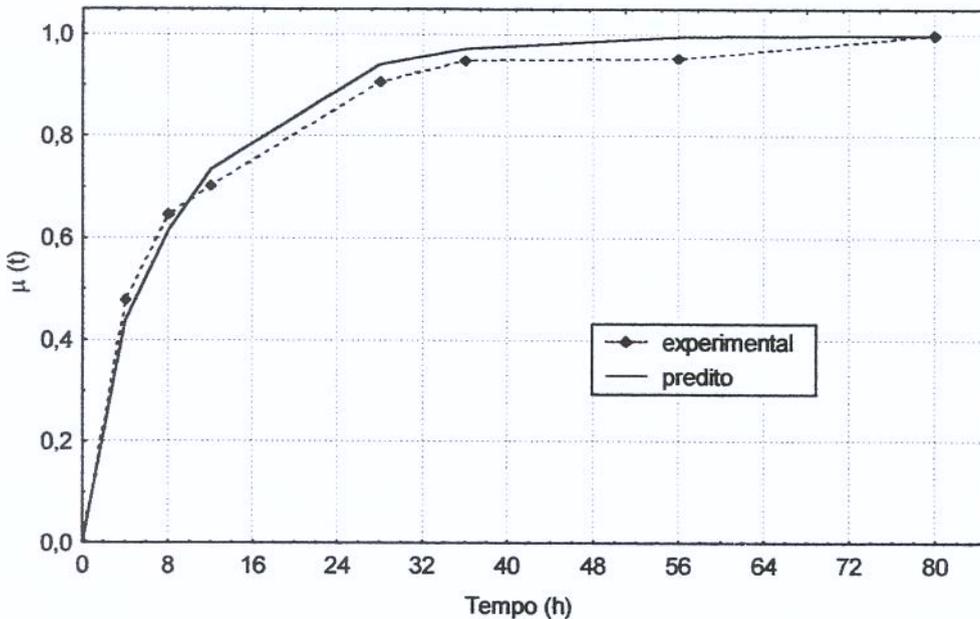


Figura 18: Massa normalizada de vapor d'água adsorvida pelos filmes protéicos de soro de leite acondicionados a 25°C e 75% de umidade relativa, na posição vertical, em função do tempo.

O coeficiente de difusão é influenciado pela estrutura do sistema e a interação da água com as macromoléculas (McCarthy et al., 1994). A determinação do mesmo tornou-se importante em filmes protéicos de soro de leite com o objetivo de definir o comportamento em ambientes que apresentam gradientes de concentração de umidade. A hidrofiliabilidade da matriz polimérica caracteriza uma alta solubilidade, e facilita a adsorção de solvente. As proteínas do soro de leite contêm grupos hidrofílicos e polares em suas estruturas, que interagem facilmente com moléculas de água, provocando o intumescimento e permitindo um maior fluxo de água na matriz polimérica (Ozdemir & Floros, 2001). A adição do glicerol, um plastificante hidrofílico, também favorece a adsorção de água nos filmes protéicos. Gallo et al. (1999) concluíram que a afinidade do composto volátil com o filme é um fator importante na transferência de massa, sendo que relaciona a interação físico-química do composto com o polímero.

6.1.2 - Adsorção na posição horizontal

Duas configurações foram estudadas na posição horizontal, a face do filme voltada para cima e para baixo, no estado estacionário. Deve-se ressaltar que durante o experimento, os filmes protéicos estavam apoiados e completamente aderidos ao suporte plano (acrílico), para evitar bolhas de ar na interface filme-placa.

O processo de difusão é expresso pela Lei de Fick, onde o fluxo do soluto é orientado pelo sentido oposto ao gradiente de concentração. Neste caso, também foi considerada a transferência de umidade pela força da gravidade com o fluxo proporcional à concentração de umidade no interior do filme. Sendo x a variável correspondente à direção do fluxo, a expressão unidimensional do fluxo na posição horizontal com a face do filme voltada para cima, sendo que o processo de difusão e a força da gravidade têm o mesmo sentido (vertical para baixo), fica:

$$J(x, t) = -D \frac{\partial}{\partial x} C(x, t) + \alpha g C(x, t) \quad (\text{Eq. 32})$$

onde $C(x, t)$ é a concentração de umidade, D o coeficiente de difusão, g é a aceleração da gravidade e α o parâmetro referente ao fluxo de umidade devido à força da gravidade.

A equação de continuidade para a transferência de umidade é:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\partial J}{\partial x} = 0 \quad (\text{Eq. 33})$$

Substituindo a Eq. (32) na (33), obtém-se:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \alpha g \frac{\partial C}{\partial x} \quad (\text{Eq. 34})$$

No estado estacionário, considera-se que $\partial C / \partial t = 0$, e sendo $\beta = (\alpha g) / D$, tem-se que:

$$\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \beta \frac{\partial C}{\partial x} = 0 \quad (\text{Eq. 35})$$

e, a solução torna-se independente do tempo,

$$\frac{d}{dx} \left(\frac{dC}{dx} - \beta C \right) = 0 \quad (\text{Eq. 36})$$

onde, $C = C(x)$.

A solução geral para a Eq.(36) pode ser escrita:

$$C(x) = A + B e^{\beta x} \quad (\text{Eq. 37})$$

onde, A e B são constantes.

A espessura é representada por L, e os limites da variável x correspondem a $x=0$, na superfície do filme e $x=L$, na base do filme (suporte plano). As dimensões da superfície horizontal (13,5 x 3,5cm) são muito maiores que a espessura do filme, podendo-se considerá-lo como placa plana infinita. Assim, o fluxo de umidade é unidirecional e vertical.

As condições de contorno são:

$$C(x = 0) = C_S \quad (\text{Eq. 38})$$

$$J(x = L) = 0 \quad (\text{Eq. 39})$$

onde, C_S é a concentração de umidade na superfície e considerando que não existe fluxo na base do filme.

Esta condição pode ser escrita da seguinte forma,

$$\left(\frac{d}{dx} C - \beta C \right)_{x=L} = 0 \quad (\text{Eq. 40})$$

Substituindo a Eq.(38) e (39) na (40), obtém-se:

$$C(x) = C_S e^{\beta x} \quad (\text{Eq. 41})$$

E a quantidade total de umidade adsorvida corresponde a integral da concentração de umidade na área superficial (S) do filme exposto:

$$M_1 = S \int_0^L C(x) dx = \frac{SC_S}{\beta} (e^{\beta L} - 1) \quad (\text{Eq. 42})$$

A segunda configuração corresponde ao sistema na posição horizontal com a face do filme voltada para baixo, considerando que o sentido do processo de difusão (vertical para cima) é contrário à força da gravidade. O método matemático é similar ao efetuado com a primeira configuração, descrito acima, com a diferença na aceleração da gravidade (-g). O sistema estando no estado estacionário, obtém-se no final:

$$C(x) = C_S e^{-\beta x} \quad (\text{Eq. 43})$$

A quantidade total de umidade adsorvida fica:

$$M_2 = S \int_0^L C(x) dx = \frac{S C_S}{\beta} (1 - e^{-\beta L}) \quad (\text{Eq. 44})$$

A razão entre essas duas massas, com a face do filme voltada para cima (M_1) e para baixo (M_2), fixa o valor de β :

$$\beta = \frac{1}{L} \ln \left(\frac{M_1}{M_2} \right) \quad (\text{Eq. 45})$$

Se o coeficiente de difusão foi determinado nas mesmas condições de umidade relativa e temperatura, o parâmetro α , referente à influência da força da gravidade no processo de difusão, é dado por:

$$\alpha = \beta \frac{D}{g} \quad (\text{Eq. 46})$$

Os dados experimentais de massa de umidade adsorvida pelos filmes protéicos de soro de leite acondicionados nas posições horizontais estão apresentados na Tabela 28. A variável m_{cima} corresponde à diferença de massa do sistema com a face do filme voltada para cima entre a massa no tempo t e a inicial ($M(t)-M_0$); m_{baixo} , é a massa absorvida para o filme com a face voltada para baixo, sendo estes valores a média de triplicata.

O estado estacionário foi atingido após 200 horas de acondicionamento para ambas as configurações. A massa de equilíbrio encontrada para a face voltada para cima foi $M_1=0,3910\text{g}$, e para baixo, $M_2=0,3925\text{g}$. Substituindo estes valores na Eq. (45), obtém-se que $\beta=0$, e conseqüentemente $\alpha=0$, ou seja, não existe fluxo de umidade produzido pela força da gravidade, sendo este devido somente à difusão.

No caso de filmes protéicos de soro de leite, a força da gravidade não contribuiu no processo de transmissão de vapor d'água, ao contrário das amostras de chocolate, observado por Antunes & Avellar (2001), associado a uma alta hidrofobicidade.

Tabela 28: Massa ganha dos filmes protéicos de soro de leite em função do tempo de acondicionamento nas posições horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo.

Tempo (h)	$m_{\text{cima}} \text{ (g)}^{\dagger}$	$m_{\text{baixo}} \text{ (g)}^{\dagger}$
0	0,0000	0,0000
4	0,1163±0,0032	0,1149±0,0084
8	0,1811±0,0071	0,1850±0,0123
12	0,2189±0,0112	0,2292±0,0094
16	0,2458±0,0139	0,2568±0,0085
28	0,3125±0,0163	0,3300±0,0110
36	0,3391±0,0172	0,3518±0,0093
56	0,3673±0,0143	0,3770±0,0072
80	0,3735±0,0197	0,3820±0,0095
104	0,3788±0,0200	0,3868±0,0098
152	0,3870±0,0224	0,3916±0,0104
200	0,3910±0,0224	0,3925±0,0106
244	0,3905±0,0221	0,3915±0,0123

[†] - média±desvio padrão

A equação diferencial para a difusão em filmes protéicos a base de soro de leite, na ausência da força da gravidade, fica:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Eq. 47})$$

As condições de contorno e inicial são definidas como:

$$C(x = 0, t) = C_S \quad (\text{Eq. 48})$$

$$\frac{\partial C}{\partial x}(x = L, t) = 0. \quad (\text{Eq. 49})$$

$$C(x, t = 0) = C_O. \quad (\text{Eq. 50})$$

Resolvendo a equação utilizando o método de séries de Fourier (Crank, 1975), a solução encontrada é:

$$C(x,t) = C_S - \frac{2}{L}(C_S - C_O) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{k_n} \text{sen}(k_n x) \exp(-Dk_n^2 t) \quad (\text{Eq. 51})$$

onde a variável k_n é definida como:

$$k_n = \frac{\pi}{2L}(2n + 1) \quad (\text{Eq. 52})$$

A quantidade de umidade adsorvida pelo filme em função do tempo na superfície (S) do filme exposto é dada por:

$$m(t) = S \int_0^t J(0, t') dt' \quad (\text{Eq. 53})$$

Sendo o fluxo de vapor d'água através da superfície do filme:

$$J(x = 0, t) = -D \frac{\partial C}{\partial x}(x = 0, t) \quad (\text{Eq. 54})$$

E, a partir das equações Eq.(51), (53) e (54), obtém-se:

$$m(t) = \frac{2S}{L}(C_S - C_O) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{k_n^2} (1 - \exp(-Dk_n^2 t)). \quad (\text{Eq. 55})$$

Sendo a massa relativa (normalizada),

$$\mu(t) = \frac{M(t) - M_O}{M_S - M_O} = \frac{m(t)}{m_{\infty}} \quad (\text{Eq.56})$$

e quando o sistema atinge o estado estacionário, a quantidade total de vapor d'água adsorvido pelo filme é dado por:

$$m(\infty) = \frac{2S}{L} (C_S - C_O) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{k_n^2} \quad (\text{Eq. 57})$$

tem-se, para a posição horizontal, o valor da massa normalizada média:

$$\mu_H(t) = \frac{m(t)}{m(\infty)} = 1 - \frac{\sum_{n=0}^{\infty} (2n+1)^{-2} \exp(-Dk_n^2 t)}{\sum_{n=0}^{\infty} (2n+1)^{-2}} \quad (\text{Eq. 58})$$

A massa média adsorvida (m_H), correspondente à média dos resultados obtidos com os filmes acondicionados com a face voltada para cima e para baixo, a massa normalizada média (μ_H) e os desvios padrão (σ_μ) calculados na posição horizontal em função do tempo de acondicionamento, podem ser analisados na Tabela 29.

Tabela 29: Massa normalizada média dos filmes protéicos a base de soro de leite (filme padrão) em função do tempo de acondicionamento nas posições horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo.

Tempo (h)	m_H (g)	$\mu_H(t)$	σ_μ
0	0,0000	0,0000	—
4	0,1156	0,2930	0,0033
8	0,1831	0,4667	0,0055
12	0,2241	0,5710	0,0170
16	0,2513	0,6403	0,0235
28	0,3213	0,8189	0,0294
36	0,3455	0,8803	0,0205
56	0,3722	0,9483	0,0250
80	0,3778	0,9732	0,0127
104	0,3828	0,9855	0,0118
152	0,3893	0,9967	0,0056
200	0,3918	1,0000	0,0370
244	0,3910	0,9975	0,0008

A partir da equação adimensional relativa de água adsorvida (Eq. 58), os dados do intervalo de 0 a 244 horas de acondicionamento foram ajustados utilizando o programa computacional Minuit (James & Ross, 1989), considerando 100 termos da série infinita, obtendo o coeficiente de difusão dos filmes protéicos a base de soro de leite na posição horizontal:

$$D_H = (5,1 \pm 0,1) \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

A concentração de água adsorvida na superfície externa dos filmes, dada pela Eq.(31), e, sendo, $M_S - M_0 = 0,3910\text{g}$ e $S = (13,5 \times 3,5) \times 10^{-4} \text{m}^2$, tem-se que,

$$C_S - C_0 = (2,79 \pm 0,10) \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

A Figura 19 apresenta a massa normalizada média da água adsorvida experimentalmente e ajustada pelo modelo, dos filmes protéicos a base de soro de leite, indicando um bom ajuste. O teor de umidade dos filmes após o acondicionamento foi de 26,48%.

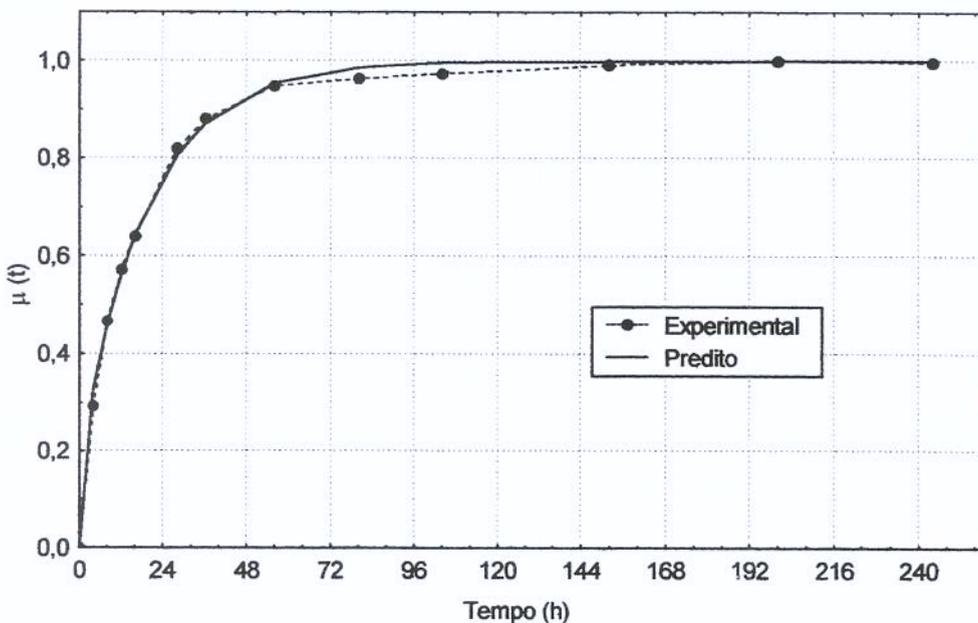


Figura 19: Massa normalizada de vapor d'água adsorvido pelos filmes a base de proteínas do soro de leite acondicionados a 75% de umidade relativa e 25°C na posição horizontal.

Segundo Brandão et al. (2001), a precisão dos parâmetros do modelo estimado é altamente dependente do planejamento experimental.

O coeficiente de difusão na posição vertical para filmes padrão ($D_V = 9,30 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) foi maior que em filmes acondicionados na posição horizontal ($D_H = 5,10 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Esta diferença foi atribuída ao efeito da adsorção de umidade pelo filme protéico de soro de leite, uma vez que se caracterizam pela natureza hidrofílica, indicando que o fenômeno da adsorção de água está interferindo no valor do coeficiente de difusão, havendo a necessidade de adicionar um termo não homogêneo no modelo matemático correspondente à adsorção (A_d). Isto foi concluído a partir de um novo estudo com filmes de diferentes espessuras, observando que quanto maior a quantidade de material hidrofílico, maior o coeficiente A_d referente à adsorção de umidade. Em filmes na posição vertical, onde o D foi maior, se concluiu que o efeito da adsorção interferiu menos no processo de difusão, uma vez que o vapor d'água permeava através de duas superfícies enquanto na horizontal através de somente uma superfície, indicando que a espessura efetiva dos filmes acondicionados na vertical correspondia à metade da espessura dos filmes acondicionados na posição horizontal, baseado no fluxo de umidade.

O processo difusivo consistiu em duas etapas, a solubilização, seguida da migração do permeante. No caso de filmes protéicos, sua característica hidrofílica, tende primeiramente adsorver as moléculas de água, reduzindo o fluxo de umidade. Na posição vertical, como duas faces estão em contato com o ambiente, o fluxo de umidade ocorreu em dois sentidos opostos (perpendicular à superfície filmogênica), enquanto que na horizontal o fluxo ocorre somente em um sentido, ou seja a curva de concentração na posição vertical corresponde a duas vezes a curva na horizontal, indicando que a espessura efetiva da vertical é a metade da horizontal, em termos de fluxo de umidade.

O intumescimento das macromoléculas da matriz filmogênica ocorre devido à sorção de moléculas de água durante a transferência, ou seja, é resultado das forças atrativas entre o filme e a água, alterando a estrutura da matriz e aumentando a permeabilidade ao vapor d'água (Banker et al. (1966), citado por Cuq et al., 1996 e por McHugh et al., 1993).

A título de comparação Antunes & Antunes (2000) determinaram o coeficiente de difusão em chocolates ($D=1,78 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), acondicionados a 75% de umidade relativa aplicando um ajuste linear nos dados experimentais de Biquet & Labuza (1988), indicando que a maior concentração de lipídios nos chocolates, reduziu a transferência de umidade através do produto.

Outro fator que deve ser ressaltado é que os sistemas dos filmes posicionados na vertical e na horizontal eram diferentes, uma vez que na horizontal o sistema continha também um anteparo de acrílico, podendo ter ocorrido menor interferência das condições ambientais durante as pesagens, ao contrário dos filmes acondicionados na posição vertical, apresentavam duas faces expostas.

6.2 - Difusão em Filmes Emulsionados

Filmes protéicos apresentam a característica hidrofílica, caracterizando uma baixa propriedade de barreira a umidade, sendo que a adição de compostos hidrofóbicos, como ácidos graxos, reduz esta característica. O processo difusivo em filmes emulsionados de soro de leite foi estudado, para verificar a influência da hidrofiliabilidade dos filmes protéicos a base de soro de leite no processo de difusão de vapor d'água. O experimento foi realizado nas três posições distintas (vertical, horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo), avaliando-se a massa de umidade adsorvida em função do tempo de acondicionamento a 25°C e 75% de umidade relativa. Deve-se ressaltar que as amostras acondicionadas na posição horizontal estavam apoiadas em um suporte acrílico, completamente aderidas a superfície, garantindo a ausência de bolhas de ar na interface filme-placa. A determinação da massa adsorvida de umidade pelos filmes foi feita até as amostras atingirem o estado estacionário.

O procedimento de preparo dos filmes foi o mesmo, com a adição de 1,0% de ácido esteárico, seguida de uma homogeneização mais rigorosa, em agitador mecânico. A obtenção dos filmes utilizados nas posições vertical e horizontal foi padronizada, ou seja, o preparo e a secagem foram os mesmos, para evitar variações nos filmes por erros experimentais. A espessura dos filmes foi determinada em 9 amostras escolhidas

aleatoriamente, podendo considerá-la como a média para todos os filmes, $(0,393 \pm 0,009)$ mm. A umidade inicial dos filmes encontrada foi 13,74%.

A escolha da adição de ácido esteárico, na concentração de 1,00%, ou seja o limite máximo encontrado na etapa de obtenção de filmes protéicos emulsionados, foi de garantir uma diferença mensurável da adsorção em relação ao filme padrão, apesar de nesta formulação os filmes não apresentarem as melhores características finais. Deve-se ressaltar que este estudo visava avaliar a influência da hidroflicidade dos filmes.

6.2.1 - Adsorção na posição vertical

O tratamento matemático seguiu o mesmo procedimento descrito no item 6.1.1 para filmes padrão, e os resultados de massa de umidade adsorvida (m_{emV}) correspondente à média de 5 amostras de filme, da massa normalizada média (μ_{emV}), e o desvio padrão (σ_{μ}) em função do tempo para os filmes emulsionados acondicionados na posição vertical a 75% de umidade relativa e 25°C, podem ser analisados na Tabela 30.

Tabela 30: Massa média de água adsorvida, massa normalizada média e desvio padrão de filmes protéicos emulsionados de soro de leite, acondicionados na posição vertical.

Tempo (h)	m_{emV} (g)	μ_{emV} (t)	σ_{μ}
0	0,0000	0,0000	—
4	0,1367	0,3520	0,0244
8	0,2042	0,5262	0,0120
12	0,2323	0,5974	0,0164
15	0,2490	0,6377	0,0193
26	0,3027	0,7751	0,0152
34	0,3205	0,8260	0,0135
50	0,3603	0,9282	0,0096
58	0,3644	0,9336	0,0018
74	0,3699	0,9407	0,0033
123	0,3899	0,9999	0,0236
171	0,3903	1,0000	0,0010

Os filmes emulsionados atingiram o equilíbrio em um tempo maior de acondicionamento ($t=123h$), quando comparados com filmes sem a adição de ácido esteárico (filme padrão), apresentando uma maior resistência à adsorção de vapor d'água pela matriz proteína-lipídio. Os dados da massa normalizada média foram ajustados com a Eq.(30), utilizando o programa computacional Minuit (James & Ross, 1989), considerando 100 termos da série infinita, obtendo o coeficiente de difusão

$$D_{emv} = (2,5 \pm 0,1) \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

E a concentração de umidade adsorvida encontrada, no estado estacionário, segundo a Eq. (31), considerando que $M_s - M_o = 0,3899g$ foi de:

$$(C_s - C_o)_{emv} = (2,10 \pm 0,13) \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

A Figura 20 mostra os dados experimentais da massa média normalizada e os preditos pelo modelo, em função do tempo de acondicionamento, indicando um bom ajuste da equação.

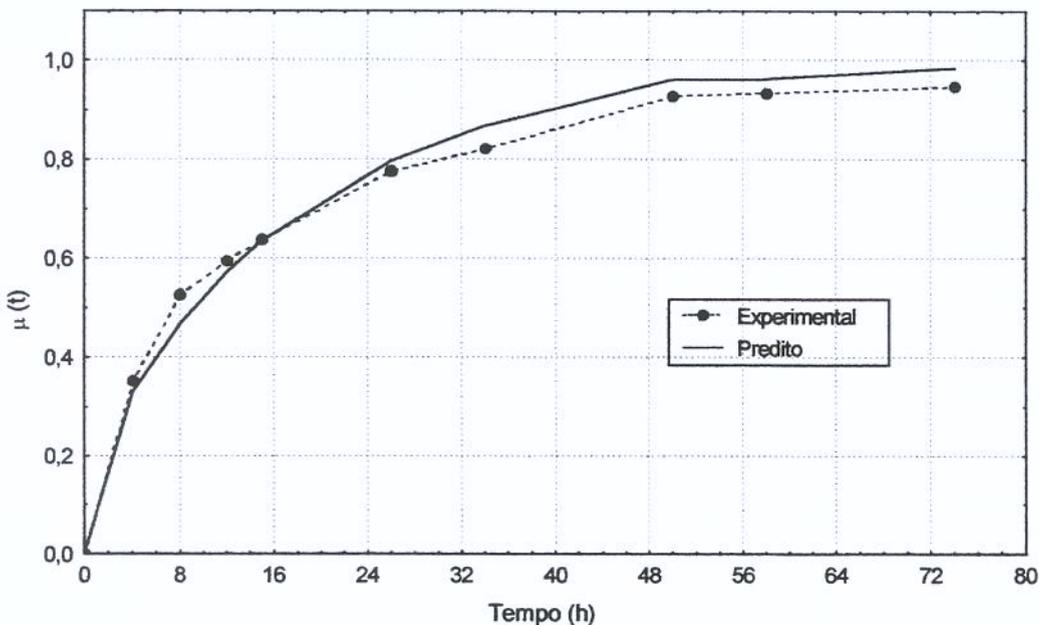


Figura 20: Massa normalizada média em função do tempo de acondicionamento dos filmes protéicos emulsionados a base de soro de leite, acondicionados na posição vertical.

A comparação entre os valores do coeficiente de difusão do filme emulsionado e filme padrão ($D_v = 9,3 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), acondicionados na posição vertical mostrou que houve um decréscimo no processo difusivo através do filme com a presença de um composto hidrofóbico (ácido esteárico) na matriz, provocando uma diminuição na transferência de massa (vapor d'água), pela redução da afinidade da matriz filmogênica pela água e modificação na estrutura filmogênica aumentando a tortuosidade, ou seja, o caminho percorrido pela molécula de água e redução do número de poros.

No estudo realizado por Ouattara et al. (2000), a incorporação de ácido láurico em filmes de quitosana, em concentração até 0,75% não provocou efeito no processo de difusão de ácido acético através dos filmes, mas com 1,00%, o coeficiente de difusão diminuiu significativamente quando comparados com filmes somente à base de quitosana, explicado pela diminuição da hidratação do filme na presença do composto hidrofóbico. E, com a adição de cinamaldeído, a concentração encontrada que reduziu o coeficiente de difusão foi de 0,5%.

6.2.2 - Adsorção na posição horizontal de filmes emulsionados

Os filmes protéicos emulsionados a base de soro de leite, apoiados e completamente aderidos a um suporte plano (acrílico), foram acondicionados na temperatura de 25°C e 75% de umidade relativa. O procedimento matemático aplicado foi o mesmo desenvolvido no item 6.1.2, sendo que os dados experimentais de adsorção de umidade dos filmes na posição horizontal, sob as duas configurações, com a face do filme voltada para baixo e para cima podem ser analisados na Tabela 31, onde m_{baixo} corresponde à média de triplicata da massa ganha em função do tempo de acondicionamento das amostras com a face do filme voltada para baixo e calculada pela diferença de massa no tempo t e a inicial; m_{cima} corresponde às amostras com a face voltada para cima.

Tabela 31: Massa ganha em filmes protéicos emulsionados de soro de leite, acondicionados na posição horizontal com a face do filme voltada para baixo e para cima.

Tempo (h)	$m_{\text{cima}} \text{ (g)}^1$	$m_{\text{baixo}} \text{ (g)}^1$
0	0,0000	0,0000
4	0,0974±0,0038	0,1091±0,0107
8	0,1535±0,0029	0,1783±0,0130
12	0,1967±0,0047	0,2288±0,0144
15	0,2178±0,0037	0,2562±0,0168
26	0,3018±0,0056	0,3407±0,0194
34	0,3531±0,0067	0,3807±0,0132
50	0,4134±0,0313	0,4412±0,0133
58	0,4433±0,0193	0,4561±0,0100
74	0,4617±0,0154	0,4817±0,0067
123	0,4976±0,0111	0,5184±0,0049
171	0,4870±0,0087	0,5355±0,0047
219	0,5157±0,0109	0,5258±0,0055
267	0,5327±0,0172	0,5319±0,0060
315	0,5213±0,0094	0,5451±0,0062

¹ - média±desvio padrão

O estado estacionário foi atingido após 267 horas de acondicionamento para ambas as configurações, representadas pela massa constante no sistema com a face voltada para cima de $M_1=0,5327\text{g}$, e para baixo, $M_2= 0,5319\text{g}$. Substituindo na Eq.(45), obtém-se que $\beta=0$, e conseqüentemente o parâmetro α é igual a zero, indicando a ausência do fluxo de umidade provocado pela força da gravidade. Este mesmo resultado foi encontrado no processo difusivo do filme padrão. A partir da média das massas das duas posições (m_{emH}), calculou-se a massa normalizada média (μ_{emH}) e o desvio padrão (σ_{μ}) em função do tempo, estando apresentado na Tabela 32.

Tabela 32: Massa média adsorvida (cima e baixo), massa normalizada média e desvio padrão dos filmes emulsionados de soro de leite acondicionados na posição horizontal.

Tempo (h)	m_{emH} (g)	μ_{emH} (t)	σ_{μ}
0	0,0000	0,0000	—
4	0,1033	0,1941	0,0083
8	0,1659	0,3117	0,0175
12	0,2128	0,4085	0,0431
15	0,2370	0,4552	0,0515
26	0,3213	0,6173	0,0523
34	0,3669	0,6893	0,0592
50	0,4273	0,8027	0,0636
58	0,4497	0,8446	0,0444
74	0,4717	0,8861	0,0531
123	0,5080	0,9543	0,0286
171	0,5113	0,9605	0,0654
219	0,5208	0,9784	0,0169
267	0,5332	1,0000	0,0006

O cálculo do coeficiente de difusão foi efetuado a partir do ajuste da Eq.(58) nos dados de $\mu_{emH}(t)$ em função do tempo, utilizando o programa computacional Minuit (James & Ross, 1989), considerando 100 termos da somatória, e o valor obtido foi

$$D_{emH} = (5,10 \pm 0,10) \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

A concentração de umidade encontrada, no estado estacionário foi calculada segundo a Eq. (31), considerando que $M_S - M_O = 0,5323\text{g}$ foi de

$$(C_S - C_O)_{emH} = (2,87 \pm 0,08) \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

A Figura 21 apresenta os valores experimentais e preditos pelo modelo da massa normalizada média dos filmes emulsionados em função do tempo na posição horizontal,

indicando que o modelo se ajustou bem aos resultados. O teor de umidade final foi determinado para os filmes protéicos emulsionados foi 26,19%.

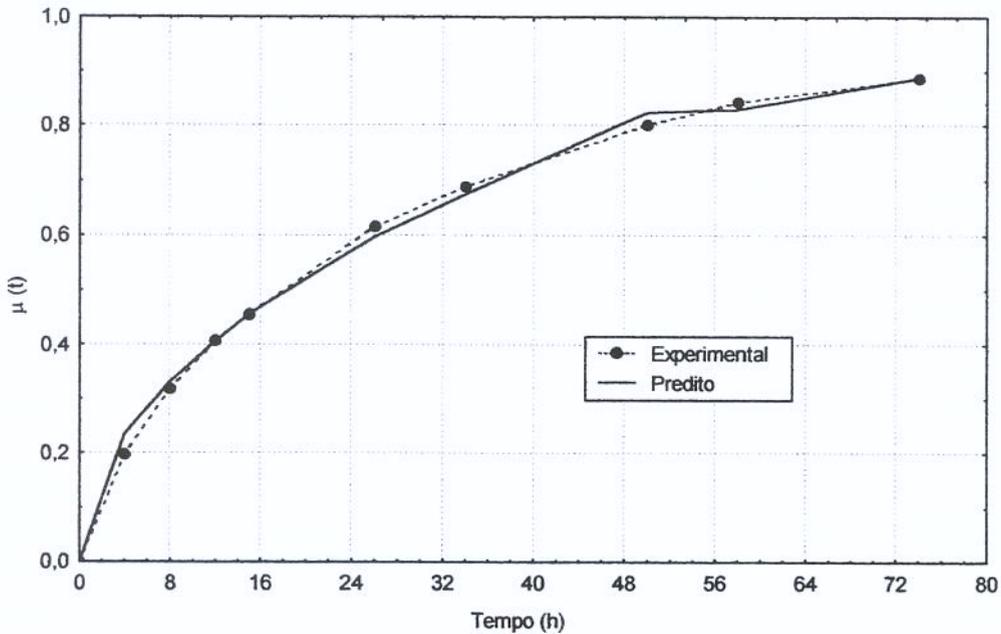


Figura 21: Massa normalizada média em função do tempo de acondicionamento dos filmes protéicos emulsionados à base de soro de leite, acondicionados na posição horizontal.

Como discutido no item anterior, o coeficiente de difusão em ambas as posições foi mascarado pela adsorção de moléculas de água pelas cadeias protéicas durante o processo difusivo, indicando novamente a necessidade de adicionar o termo não homogêneo referente à adsorção de umidade (A_d). Neste caso de filmes emulsionados, observou-se que a posição vertical, que apresentava duas superfícies em contato com a condição ambiente apresentou menor interferência pela falta do termo A_d , indicando um menor coeficiente de difusão em relação ao do filme padrão.

A homogeneização da solução filmogênica contendo lipídio é uma etapa importante na obtenção de filmes emulsionados, onde quanto menor a partícula lipídica mais estável é a emulsão, formando uma matriz filmogênica mais homogênea e estável. Os filmes protéicos de soro de leite contendo 1,00% de ácido esteárico apresentaram partículas insolúveis lipídicas indicando que a emulsão formada não foi completamente

estável, tendo ocorrido a separação de fases durante o período de secagem, formando um gradiente de concentração de lipídio através da espessura, com maior valor na superfície em contato com o suporte plano, devendo ressaltar que não houve a formação de filmes bicamadas. Isto explica o valor do coeficiente de difusão do filme emulsionado acondicionado na posição horizontal encontrado ser igual ao valor obtido para a adsorção de umidade em filmes padrão ($D_H = 5,10 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) na mesma posição, associando que a difusão ocorreu principalmente na fase protéica dos filmes (parte superior em contato com o ar ambiente), uma vez que o composto hidrofóbico é apolar e não se liga a moléculas de água. Resultado contrário foi encontrado no plano vertical, onde um menor coeficiente de difusão foi encontrado para filmes emulsionados, onde o processo difusivo foi reduzido com a presença do ácido esteárico, mas neste caso, todas as faces do filme, tanto a fase com maior concentração de proteína, como a fase com maior concentração de lipídio, estavam em contato com a mesma condição ambiente.

É importante ressaltar que as espessuras dos filmes emulsionados ($e_{em} = 0,393\text{mm}$) eram maiores que dos filmes padrão ($e_p = 0,297\text{mm}$), apesar do volume de solução filmogênica aplicado nas placas ter sido o mesmo, e uma vez que o teor de proteína era igual, o aumento da espessura foi decorrente da presença do ácido esteárico na formulação.

A orientação dos filmes protéicos emulsionados durante a determinação da permeabilidade ao vapor d'água foi considerada um fator importante, ou seja, a aplicação dos filmes emulsionados com a face do filme com maior concentração lipídica para cima na célula de medida, em contato com o ambiente de maior umidade relativa, apresentou valores menores de permeabilidade do que em contato com a condição de menor umidade relativa (voltada para o dessecante), sendo que a natureza hidrofílica das proteínas contribuiu menos nesta propriedade quando sua face estava voltada para o ambiente mais seco (McHugh & Krochta, 1994e). Pérez- Gago & Krochta (1999) observaram a separação de fases em filmes de proteínas de soro de leite emulsionados com cera de abelha e fração lipídica do leite, e constataram a diferença na permeabilidade ao vapor d'água em função da orientação dos filmes na célula de medida.

A adição de cera de abelha e monoglicerídios acetilados em filmes de glúten resultou na redução em 20-50% no coeficiente de difusão de ácido sórbico (alta solubilidade em água) através dos filmes, atribuindo que a difusão ocorreu principalmente na fase proteína-plastificante, sendo os valores encontrados, a título de comparação, $2,5 \times 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$, para cera de abelha e $2,7 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, para monoglicerídios acetilados. O lipídio aumenta a tortuosidade, aumentando o caminho difusivo (Redl et al., 1996). Ouattara et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes com a adição de ácido láurico em filmes de quitosana, onde o valor do coeficiente de difusão de ácido acético através dos filmes reduziu substancialmente em relação ao filme controle, quando imersos em solução aquosa.

O termo $C_s - C_o$ indica a concentração mássica dos filmes no estado estacionário, depende do material e das condições de acondicionamento, neste caso, 75% de umidade relativa e 25°C, sendo a massa de umidade na unidade de volume do filme. Os valores obtidos em filmes padrão e emulsionado na posição vertical foram similares, o mesmo ocorreu na posição horizontal. Indicando que as moléculas de água ligaram-se às cadeias protéicas ou moléculas de plastificante (glicerol), uma vez que os teores de proteína e plastificante em todas as formulações utilizadas foram mantidos constantes. A título de comparação, o teor de umidade (em base seca) dos filmes no final do experimento encontrado nas diferentes condições foi em média de 0,3693 kg/kg (base seca), que corresponde à condição de equilíbrio encontrada anteriormente na construção da isoterma de sorção a 25°C e 75% de umidade relativa.

6.3 – Conclusões Parciais

Um modelo linear descreveu a difusão de vapor d'água através dos filmes protéicos de soro de leite, acondicionados em diferentes posições, vertical e horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo. O coeficiente de difusão obtido a partir do ajuste do modelo aos resultados de adsorção dos filmes protéicos acondicionados na posição vertical foi de $D_v = 9,3 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e a densidade de água adsorvida foi $C_s - C_o = 2,05 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

Um modelo para descrever o transporte de vapor d'água através do filme protéico de soro de leite foi desenvolvido, considerando a influência de duas forças no processo de adsorção, a força da gravidade e a difusão. A partir dos dados experimentais, pôde-se concluir que a força da gravidade não apresentou efeito no processo de adsorção, e o cálculo do coeficiente de difusão e da concentração de umidade na superfície foi feito a partir de um modelo linear de difusão. Os coeficientes de difusão dos filmes na posição horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo não apresentaram diferença significativa, então foram calculados a partir da média das massas de vapor d'água adsorvida nas duas posições, encontrando $D_H = 5,10 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e $C_S - C_O = 2,79 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

A adição de um composto hidrofóbico (ácido esteárico) na formulação de filmes protéicos de soro de leite reduziu o coeficiente de difusão dos filmes acondicionados na posição vertical, $D_{emV} = 2,50 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e $(C_S - C_O)_{emV} = 2,10 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Nos filmes acondicionados na posição horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo não se constatou diferença significativa, indicando que a força da gravidade não provocou efeito no processo difusivo do vapor d'água, e os valores encontrados foram $D_{emH} = 5,10 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e $(C_S - C_O)_{emH} = 2,87 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Os coeficientes de difusão dos filmes padrão e emulsionados, acondicionados na posição horizontal não apresentaram diferença significativa, associada à formação de um gradiente de concentração lipídica, devido à separação de fases durante a secagem e à diferença de espessura.

CAPÍTULO 7

7 - Modificação Enzimática nos Filmes de Soro de Leite

A enzima transglutaminase promove ligações inter e intramoleculares em diferentes tipos de proteínas, e a reação cruzada em proteínas do soro de leite tem sido estudada como um mecanismo para a obtenção de filmes comestíveis com melhores propriedades de barreira e mecânicas, resultado da formação de uma rede mais estável e compacta. A transglutaminase promove interações entre as cadeias de proteínas do soro de leite, ligando resíduos de glutamina e lisina.

Neste experimento, utilizou-se a transglutaminase microbiana cedida pela Ajinomoto Interamericana Ltda., contida em um produto, ACTIVA TG-MP, com composição total de 1,0% de transglutaminase, 10% de dextrina e 89% de lactose, com atividade enzimática de 85-125U/g proteína (média 100U/g proteína), segundo dados fornecidos pela empresa. É importante ressaltar que outros produtos contendo a enzima e com composição básica diferente foram testados para a obtenção de filmes protéicos de soro de leite, não obtendo êxito nas características finais. Uma vez determinado o produto a ser aplicado na formulação filmogênica, os efeitos provocados pela concentração de enzima e tempo de reação foram analisados através das propriedades finais dos filmes (solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação), por eletroforese SDS-PAGE e por exclusão molecular (HPLC).

7.1 - Efeito da Concentração de Enzima

A concentração de enzima (C_E) foi adotada como unidade de transglutaminase por grama de proteína, variando na faixa de 0 a 50U/g proteína (0, 10, 20, 30, 40 e 50U/g proteína). O tempo de reação foi mantido em 180 minutos e a temperatura foi controlada através de banho-maria com agitação em 50°C (temperatura ótima de ação da enzima). A formulação básica do filme consistiu na formulação do filme padrão, 6,5% de proteína, 3,0% de plastificante (glicerol) e pH 7,0 (pH ótimo da enzima). Em seguida à reação, a solução foi aquecida em banho-maria a 80°C para inativar a enzima.

Os filmes formados em diferentes concentrações de enzima apresentaram flexibilidade alta, fragilidade moderada, cor levemente amarelada, transparência e homogeneidade. Em concentrações acima de 30U/g proteína, após o acondicionamento a 75% de umidade relativa e 25°C, os filmes tornavam-se opacos, apresentando manchas brancas, aumentando a intensidade proporcionalmente à quantidade de produto adicionado, estes filmes eram mais úmidos e frágeis. As formulações sem a adição de transglutaminase formaram filmes com flexibilidade baixa e fragilidade alta. A aparência e manuseio dos filmes protéicos são fatores importantes na determinação da melhor concentração de enzima na formulação filmogênica, uma vez que ocorrem alterações físicas quando submetidos a diferentes condições de umidade relativa.

7.1.1 - Solubilidade protéica

A solubilidade é uma propriedade importante em filmes protéicos, pois a aplicação em alimentos com alto teor de umidade requer resistência à água, e em outros casos requer solubilidade após o consumo (Stuchell & Krochta, 1995; Pérez-Gago et al., 1999). A Tabela 33 apresenta os valores do teor de proteína, teor de umidade e solubilidade protéica dos filmes em função da concentração de enzima. A solubilidade protéica dos filmes modificados enzimaticamente correspondeu a monômeros protéicos, pequenos peptídeos e material não protéico, pois os filmes permaneceram intactos após 48 horas de incubação em tampão aquoso (pH 7,0).

Tabela 33: Teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica dos filmes a base de soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.

C_E (U/g proteína)	Tempo (min)	Proteína (%) ¹	X (%)	Solubilidade protéica (%) ¹
0	180	61,03	13,17	0,7281±0,0214 ^a
10		57,69	14,22	0,9067±0,0117 ^a
20		51,01	18,82	1,4226±0,0132 ^b
30		47,82	20,00	1,4261±0,0145 ^b
40		44,36	16,33	1,5339±0,0103 ^b
50		42,97	18,88	2,3064±0,0194 ^c

a, b, c – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA); 1- determinado em 0,1g de filme.
1 - média±desvio padrão

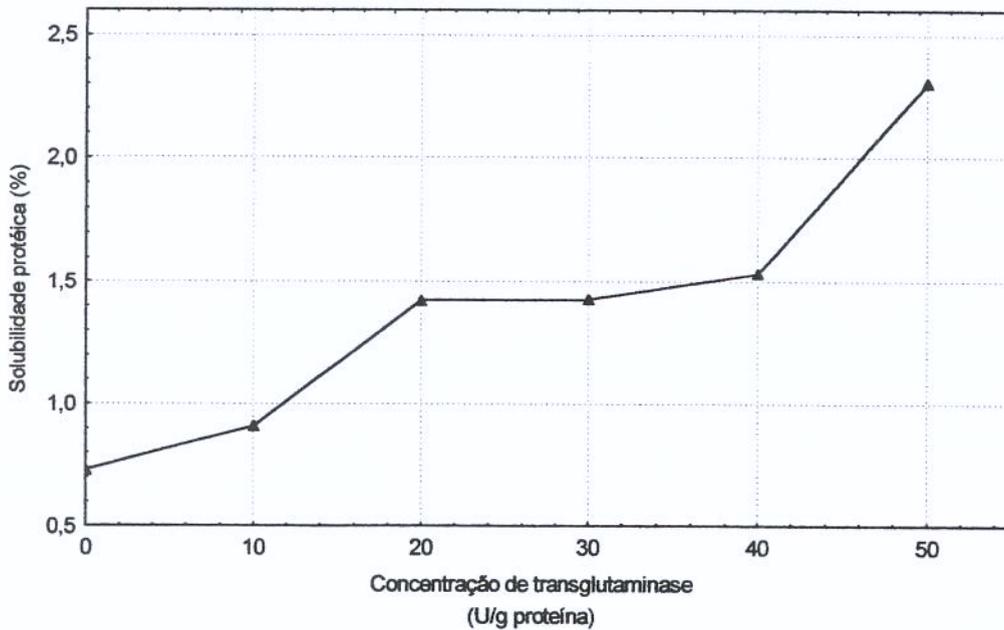


Figura 22: Efeito da concentração de transglutaminase na solubilidade protéica dos filmes a base de proteína do soro de leite.

O aumento da solubilidade protéica em função da concentração de enzima (Figura 22) foi associado à presença de outras substâncias no produto que contém a enzima (ACTIVA TG-MP), a lactose e a dextrina, que podem ter interferido nas ligações intermoleculares das cadeias protéicas. Quanto maior a concentração de transglutaminase adicionada, maior foi a quantidade de produto incorporado, ou seja

maior a massa de lactose presente, alterando a formação da matriz protéica durante a polimerização, indicado por um maior número de monômeros protéicos que não participaram da rede. Fairley et al. (1996) concluíram que a solubilidade protéica dos filmes aumentou com a inibição de ligações covalentes intermoleculares entre as cadeias de proteínas. Resultados contrários foram obtidos por Lorenzen (2000) em filmes a base de caseinato de sódio e por Yildirim et al. (1996) em filmes a base de isolado protéico de soro de leite, utilizando a enzima purificada.

Um estudo comparativo foi realizado, adicionando lactose e dextrina na solução filmogênica sem a presença da transglutaminase, em concentrações proporcionais às formulações trabalhadas contendo a enzima (referente a composição do produto), equivalente às formulações com 10U e 50U/g proteína, ou seja, a menor e maior concentração destes compostos presentes nas soluções filmogênicas. Na Tabela 34 estão os resultados da solubilidade protéica e o teor de proteína dos filmes formados sem a adição da enzima e na presença de lactose e dextrina. Estes filmes caracterizaram por alta fragilidade, dificultando o manuseio durante as determinações das propriedades, e na maior concentração de lactose, depois de acondicionados em 75% de umidade relativa, alteravam seu aspecto físico, apresentando uma coloração branca, rugosidade e pouca flexibilidade.

Tabela 34: Teor de proteína e solubilidade protéica de filmes sem adição de transglutaminase e na presença de lactose e dextrina.

Concentração de lactose e dextrina equivalente	Tempo de reação (min)	Proteína (%) ¹	Solubilidade protéica (%) ²
~10U TG	180	57,69	0,9041±0,0245
~50U TG		41,50	1,3281±0,0218

1-em 0,1g de filme; 2 - média±desvio padrão

A partir dos dados da Tabela 33 e 34, concluiu-se que filmes com e sem 10U de transglutaminase, na presença de lactose e dextrina não apresentaram diferença significativa na solubilidade protéica, mas em filmes com 50U transglutaminase, a ausência da enzima reduziu a solubilidade protéica, indicando uma menor quantidade de monômeros protéicos que não participaram da matriz filmogênica, portanto altas

concentrações de lactose interferiram na atuação da enzima durante a formação de ligações cruzadas entre as cadeias protéicas.

O açúcar estabiliza a estrutura da proteína à desnaturação térmica, reduzindo o desenrolamento das proteínas do soro de leite, assim a presença da lactose pode estar influenciando durante a formação da matriz filmogênica, inibindo as ligações inter e intramoleculares entre as cadeias protéicas. Rich & Foegeding (2000) determinaram a influência da lactose na desnaturação das proteínas de isolado protéico de soro de leite, verificando a necessidade de um maior tempo e temperatura na gelatinização. Spiegel (1999) observou que a proteína β -lactoglobulina apresentou maior estabilidade em sua forma nativa na presença de lactose na solução. A reatividade redutora da lactose é a menor entre açúcares redutores como frutose, glicose, rabinose.

7.1.2 - Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água em função da concentração de enzima foi determinada a 75% de umidade relativa e 25°C, e os resultados podem ser analisados na Tabela 35 e Figura 23. A espessura média dos filmes encontrada foi de $(0,092 \pm 0,006)$ mm.

Tabela 35: Permeabilidade ao vapor d'água em função da concentração de transglutaminase adicionada em filmes protéicos a base de soro de leite.

C_E (U/g proteína)	Tempo (min)	Permeabilidade ao vapor d'água ($\text{gmm}/\text{hm}^2\text{kPa}$) ¹
0	180	$0,3329 \pm 0,0113^a$
10		$0,2718 \pm 0,0150^b$
20		$0,2729 \pm 0,0094^b$
30		$0,2938 \pm 0,0134^b$
40		$0,3435 \pm 0,0277^a$
50		$0,3554 \pm 0,0135^a$

a, b – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média \pm desvio padrão

O aumento da concentração de enzima diminuiu a permeabilidade ao vapor d'água, indicando a formação de uma matriz protéica com maior número de ligações entre as cadeias das proteínas, que participaram da rede. O menor valor de permeabilidade obtido foi para a formulação com 10U/g proteína, reduzindo em aproximadamente 18,35% em relação à 0U/g proteína. A variação entre os valores de permeabilidade ao vapor d'água entre as concentrações de enzima de 10, 20 e 30U/g proteína não foi significativa, então a formulação contendo 10U/g proteína foi considerada a melhor para a obtenção de filmes protéicos de soro de leite, pois utilizou menor quantidade de produto e não sofreu alterações físicas após acondicionamento em umidade relativa maior (75%).

Nas concentrações de 40 e 50U/g proteína, a permeabilidade ao vapor d'água aumentou, relacionada a uma maior concentração de lactose adicionada, que além de interferir na formação de uma rede protéica compacta e homogênea, é também um composto higroscópico, favorecendo a ligação com moléculas de água.

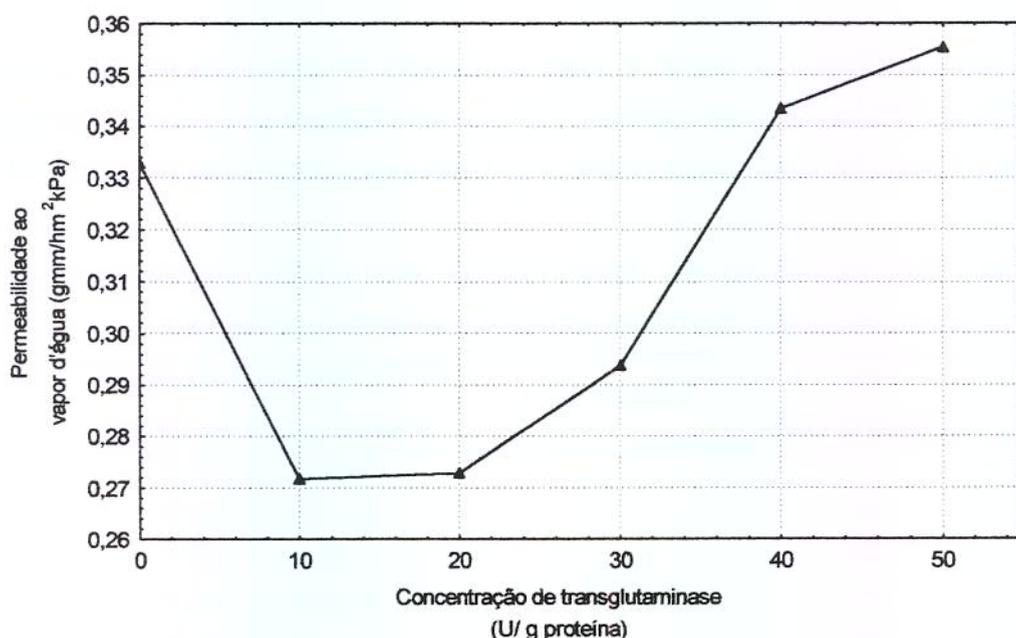


Figura 23: Permeabilidade ao vapor d'água de filmes protéicos a base de soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.

A permeabilidade ao vapor d'água de filmes sem a adição de transglutaminase, e contendo lactose e dextrina em proporções equivalentes às formulações com 10U e 50U/

g proteína de transglutaminase encontrada foi de $(0,3618 \pm 0,0146)$ gmm/hm²kPa e $(0,3763 \pm 0,0041)$ gmm/hm²kPa, respectivamente, comprovando a atuação da enzima na obtenção dos filmes, que mesmo na presença destes compostos, reduziu esta propriedade.

Li & Chen (1999) estudaram o efeito da transglutaminase em filmes a base de concentrado e isolado protéico de soro de leite, e obtiveram valores menores de permeabilidade ao vapor d'água, mas a redução nos filmes de isolado protéico foi muito pequena. Sabato et al. (2001) aumentaram o número de ligações covalentes na matriz de filmes de soja e soro de leite através de irradiação, que reduziram o valor da permeabilidade ao vapor d'água.

Desta forma, a presença da enzima transglutaminase favoreceu a formação de um maior número de ligações inter e intramolecular entre as cadeias das proteínas de soro de leite, reduzindo o volume livre e a difusividade do permeante através da matriz, e, conseqüentemente a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes. Quanto maior a concentração de lactose, maior a permeabilidade ao vapor d'água, ou seja, menor a propriedade de barreira dos filmes, confirmando a interferência das moléculas de lactose na formação da rede protéica, criando espaços vazios, estabilizando a proteína, além de sua característica higroscópica que aumenta a ligação com moléculas de água, permitindo um maior fluxo de umidade.

7.1.3 - Tensão na ruptura e alongação

As propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas com a distribuição e concentração das interações inter e intramoleculares na estrutura filmogênica. Quando ligações covalentes estabilizam a matriz filmogênica ou quando a densidade de energia de ligação é alta, os filmes apresentam grande resistência à ruptura e maior elasticidade (CUQ et al., 1998). A avaliação dos filmes quanto à tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos em função da concentração de transglutaminase adicionada pode ser analisada na Tabela 36 e Figura 24. A tensão na ruptura aumentou até a concentração de 20U/g proteína, evidenciando a eficiência da enzima em ligar as

cadeias protéicas através de ligações isopeptídicas, formando uma rede mais estável, aumentando a força de tração que o filme pode sustentar antes de romper.

Tabela 36: Tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos a base de soro de leite em função da concentração de transglutaminase adicionada na solução.

C_E (U/g proteína)	Tempo (min)	Tensão na ruptura (MPa) ¹	Elongação (%) ¹
0	180	1,9987±0,0646 ^a	32,46±1,96 ^d
10		3,0752±0,3201 ^b	72,02±1,11 ^e
20		3,4029±0,1222 ^b	33,58±0,62 ^d
30		2,1753±0,0270 ^a	20,58±0,26 ^f
40		1,7991±0,0386 ^a	13,42±0,17 ^g
50		0,8119±0,0165 ^c	12,11±0,32 ^g

a, b, c, d, e, f, g – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

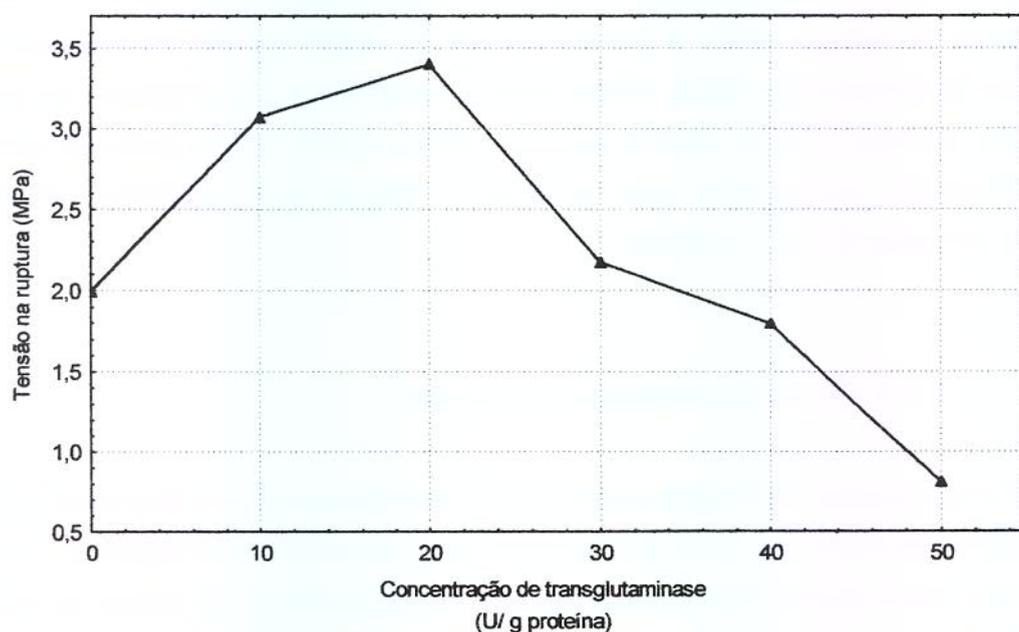


Figura 24: Tensão na ruptura dos filmes a base de proteína do soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase.

Em concentrações acima de 30U/g proteína, a força de tensão diminuiu, explicada pela maior quantidade de lactose adicionada na solução filmogênica (contida no produto), atuando como espaços vazios, pontos de falha na matriz filmogênica. Esta característica foi confirmada pela aparência dos filmes após acondicionamento a 75% de umidade relativa, que apresentaram uma coloração esbranquiçada, fragilidade alta e difícil manuseio.

Yildirim & Hettiarachchy (1998) obtiveram filmes a base de soro de leite com maior tensão na ruptura quando se adicionou transglutaminase, devido à formação de ligações peptídicas covalentes na estrutura protéica aumentando a tração dos filmes. Em géis de surimi, Sakamoto et al. (1995) encontraram uma concentração limite de transglutaminase, e valores superiores provocaram um decréscimo no "jelly strength", associado a uma formação excessiva de ligações G-L, inibindo o desenvolvimento uniforme da rede protéica.

A ação da transglutaminase promoveu maior elasticidade nos filmes protéicos a base de soro de leite na concentração de 10U/g proteína, com um valor duas vezes maior em relação ao filme sem adição da enzima, aumentando a capacidade de deformar a estrutura molecular (Figura 25). Os filmes contendo concentrações maiores que 10U/g proteína tenderam a reduzir a porcentagem de alongação, indicando a formação de uma matriz polimérica não contínua, associada à presença da lactose. A partir destes resultados, filmes protéicos de soro de leite contendo 10U/g formaram uma matriz protéica mais estável (maior tensão na ruptura) e elástica (maior porcentagem de alongação), considerando esta concentração de enzima como a melhor na obtenção de filmes com boas propriedades mecânicas.

A confirmação da atuação da enzima, verificando a influência da presença da lactose nas características finais dos filmes, quanto à tensão na ruptura e porcentagem de alongação, foi determinada através da ausência de transglutaminase e adição de lactose e dextrina, em concentrações equivalentes às formulações contendo 10U e 50U/g proteína, como ilustra a Tabela 37.

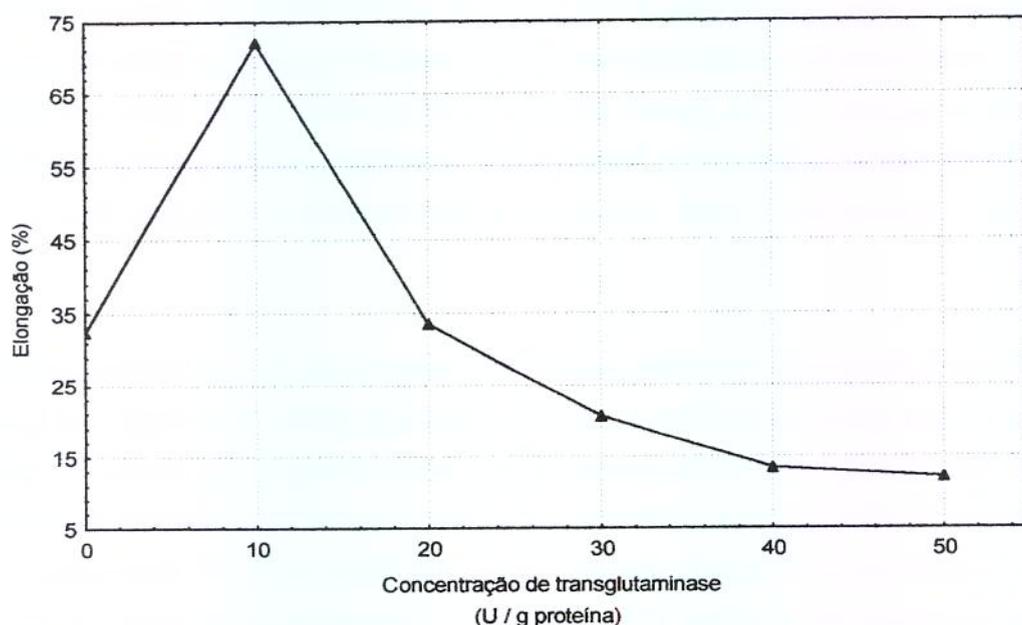


Figura 25: Porcentagem de alongação dos filmes a base de proteína do soro de leite catalisados com diferentes concentrações de transglutaminase

Tabela 37: Tensão na ruptura e porcentagem de alongação de filmes protéicos a base de soro de leite obtidos sem a adição de transglutaminase e na presença de lactose e dextrina em concentrações equivalentes.

Concentração de lactose e dextrina equivalentes	Tensão na ruptura (MPa) ¹	Elongação (%) ¹
~10U TG	1,8360±0,1956	13,85±0,12
~50U TG	1,4392±0,0076	11,92±0,87

1 - média±desvio padrão

Filmes protéicos obtidos na ausência de enzima caracterizaram por menor tensão na ruptura e porcentagem de alongação, sendo mais frágeis e menos elásticos quando comparados com filmes obtidos através da ação da enzima. A transglutaminase promoveu ligações peptídicas cruzadas entre as proteínas do soro de leite formando uma matriz mais compacta, estável e elástica. A presença da lactose é um fator limitante dependendo da concentração adicionada, onde o excesso pode interferir na rede protéica, formando filmes frágeis, quebradiços e mais permeáveis à umidade. Como conclusão, a adição do produto ACTIVA TG-MP é viável em concentrações controladas, até 10U/ g proteína.

7.2 - Efeito do Tempo de Reação

A partir dos resultados do efeito da concentração de transglutaminase, determinou-se a formulação filmogênica contendo 10U/g proteína como a que melhor representa a reação de catálise na formação de filmes protéicos a base de soro de leite, neste estudo. O tempo de reação cruzada na obtenção de filmes protéicos foi estudado, fixando a formulação em 6,5% de proteína, 3,0% de plastificante (glicerol), pH 7,0, com a presença (10U/g proteína) e a ausência da enzima transglutaminase. A temperatura da solução foi mantida constante a 50°C (temperatura ótima da enzima), através de um banho-maria com agitação. Os intervalos do tempo de reação estipulados foram de 0, 60, 120, 180 e 240 minutos, e a avaliação foi feita através das características finais dos filmes (solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação). A caracterização dos filmes protéicos (teor de proteína e umidade) na presença (com TG) e na ausência (sem TG) da enzima transglutaminase está apresentada na Tabela 38.

Tabela 38: Teor de proteína, e teor de umidade de filmes protéicos a base de soro de leite obtidos com e sem adição de transglutaminase em função do tempo de reação.

Tempo (min)	C _E (U/g proteína)	com TG		sem TG	
		Proteína (%) ¹	X (%)	Proteína (%) ¹	X (%)
0		56,64	14,22	62,26	15,00
60		57,46	12,95	60,91	13,43
120	10	57,46	13,39	60,40	13,87
180		57,69	14,22	61,03	13,17
240		56,65	13,67	60,81	14,06

¹-em 0,1g de filme

Filmes protéicos com a adição de transglutaminase apresentaram flexibilidade alta, homogeneidade, fragilidade moderada após os 60min de reação. A ausência da enzima provocou a formação de filmes com baixa flexibilidade, fragilidade alta, principalmente no tempo 0 min. Em todas as formulações, os filmes apresentaram uma cor levemente amarelada e transparência. A espessura média encontrada foi de (0,082±0,002)mm.

Na formação dos filmes sem a transglutaminase pode ter ocorrido por uma desnaturação parcial nas proteínas do soro de leite durante as etapas do processo com tratamento térmico, como a incubação ($T=50^{\circ}\text{C}$) e a inativação da enzima ($T=80^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos). São tratamentos moderados e não suficientes para a desnaturação completa das proteínas de soro de leite, formando filmes mais frágeis e sem flexibilidade. Aguilera (1995) afirmou que a extensão da desnaturação das proteínas depende do tempo e temperatura. Segundo DeWit & Klarenbeek (1984), a temperatura de desnaturação do CPS está entre 62-78%, e a condição necessária para garantir a desnaturação completa deve ser 90°C por 30 minutos. Havea et al. (1998) estudaram o efeito do tempo de desnaturação das proteínas do soro de leite à 75°C , observando que após 12 minutos de incubação, aproximadamente 70% da β -lg e 50% da α -la permaneceram sob a forma nativa.

7.2.1 - Solubilidade protéica

A solubilidade protéica dos filmes com a presença (com TG) e a ausência (sem TG) da transglutaminase, em função do tempo de reação estão apresentados na Tabela 39 e Figura 26, e os resultados foram associados a monômeros de proteína, pequenos peptídeos, e material não protéico, uma vez que os filmes mantiveram-se intactos após a incubação em tampão aquoso.

Tabela 39: Solubilidade protéica dos filmes a base de proteínas do soro de leite, na presença (10U/g proteína) e ausência da transglutaminase.

Tempo de reação (min)	Solubilidade Protéica (%) ¹	
	Com TG	Sem TG
0	0,9405±0,0120 ^a	0,7486±0,0400 ^b
60	0,8242±0,0117 ^{bc}	0,7930±0,0296 ^b
120	0,8852±0,0001 ^{acd}	0,7895±0,0108 ^b
180	0,8818±0,0235 ^{ace}	0,7509±0,0107 ^b
240	0,9403±0,0120 ^a	0,8146±0,0266 ^{bde}

a, b, c, d, e – diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

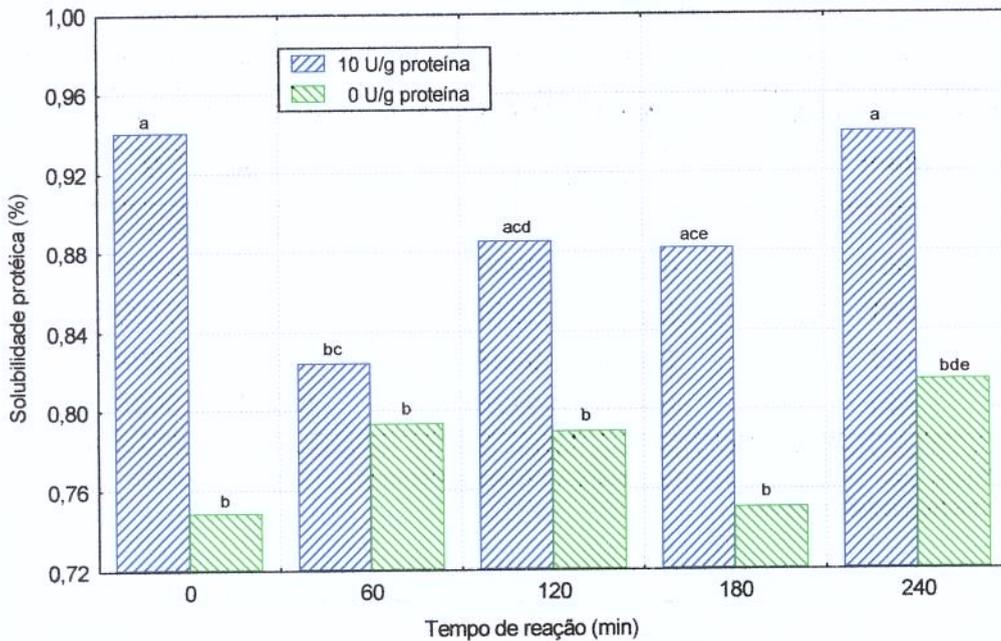


Figura 26: Solubilidade protéica dos filmes a base de soro de leite, com e sem adição de transglutaminase, em função do tempo de reação.

A presença da enzima na solução filmogênica aumentou a solubilidade protéica dos filmes, quando comparada com a da ausência, sendo que a lactose pode ter sido um interferente na formação da rede protéica, uma vez que açúcares atuam como inibidor na desnaturação da proteína. A solubilidade protéica dos filmes tratados pela transglutaminase diminuiu após 60, 120 e 180 minutos de reação, quando uma menor quantidade de monômeros protéicos não participou da formação da matriz filmogênica, e em 240 minutos de incubação, a solubilidade protéica aproximou-se novamente do tempo zero. A ausência de transglutaminase formou filmes que não apresentaram diferença estatisticamente significativa na solubilidade protéica em função do tempo.

7.2.2 - Permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água dos filmes com e sem a transglutaminase, em função do tempo de reação, pode ser analisada na Tabela 40 e Figura 27.

Tabela 40: Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes protéicos a base de soro de leite, com (10U/g proteína) e sem adição de transglutaminase em função do tempo de reação.

Tempo de reação (min)	Permeabilidade ao vapor d'água (gmm/hm ² kPa) ¹	
	Com TG	Sem TG
0	0,3117±0,0078 ^{ab}	0,3125±0,0070 ^{ab}
60	0,3040±0,0035 ^a	0,3102±0,0046 ^{ab}
120	0,3097±0,0019 ^{ab}	0,3113±0,0100 ^{ab}
180	0,2705±0,0057 ^c	0,3264±0,0004 ^{ab}
240	0,2510±0,0125 ^c	0,3361±0,0035 ^b

a, b, c – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

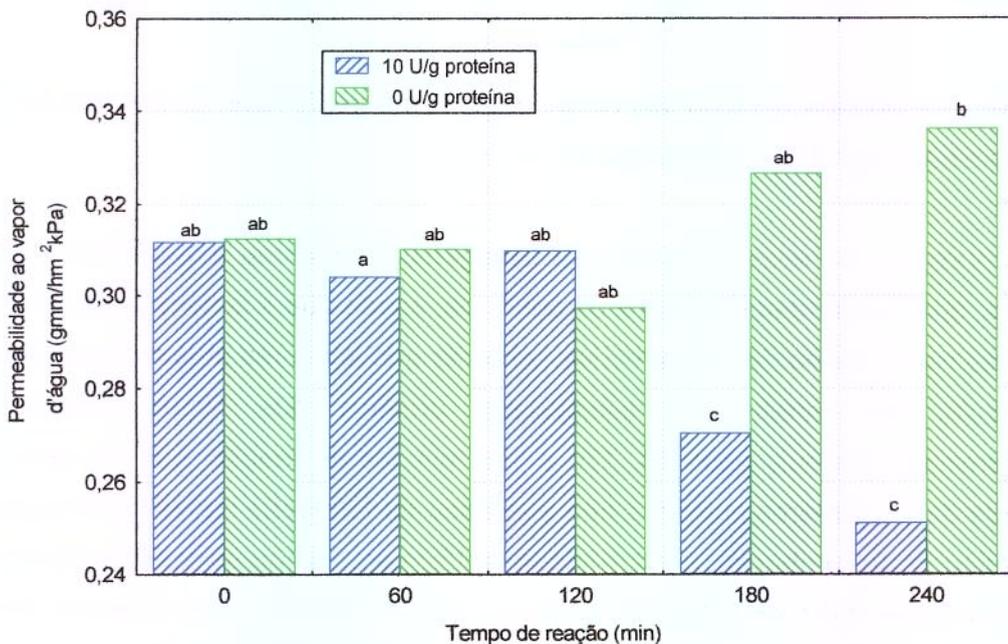


Figura 27: Permeabilidade ao vapor d'água de filmes protéicos a base de soro de leite com e sem adição de transglutaminase em função do tempo de reação.

A permeabilidade ao vapor d'água manteve-se constante até 120 minutos de reação em ambas formulações (com e sem transglutaminase). Em 180 minutos, as tendências encontradas foram contrárias: nos filmes tratados com a enzima, a permeabilidade ao vapor d'água diminuiu e, sem a enzima, aumentou, observando a influência da enzima na formação de um maior número de ligações inter e

intramoleculares entre as cadeias protéicas, diminuindo os espaços vazios, reduzindo a difusividade das moléculas de água através da matriz filmogênica. O melhor valor desta propriedade foi no tempo de 240 minutos, equivalente a 19,47% menor que no tempo zero (0 min).

Os filmes obtidos sem a adição de transglutaminase não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os valores da permeabilidade ao vapor d'água em função do tempo de reação. A morfologia e o grau de reação cruzada são fatores importantes nas propriedades de barreira de filmes protéicos.

Li & Chen (1999) determinaram um tempo de incubação ótimo para filmes protéicos a base de soro de leite com transglutaminase microbiana de 4 horas, apresentando o menor valor de permeabilidade ao vapor d'água. Yildirim & Hettiarachchy (1998) observaram uma tendência contrária, o aumento da permeabilidade ao vapor d'água em filmes a base de isolado protéico de soro de leite, catalisados pela transglutaminase, quando comparados com filmes sem a adição da enzima, sendo explicado pela formação de um maior número ou tamanho de poros durante a reação cruzada, ou seja, a orientação das moléculas de proteína formou poros adicionais ou aumentou o tamanho dos poros já existentes.

7.2.3 - Tensão na ruptura e alongação

A tensão na ruptura e a porcentagem de alongação descrevem as propriedades mecânicas dos filmes em função de sua estrutura química (Pérez-Gago et al., 1999). A Tabela 41 apresenta os resultados destas propriedades para os filmes obtidos com a presença (com TG) e ausência (sem TG) de transglutaminase na formulação filmogênica. A tensão na ruptura dos filmes catalisados pela enzima aumentou em 56,35% ($t=180$ min) em relação ao ponto zero ($t=0$ min), e a alongação em 49,50% ($t=180$ min), mostrando uma melhora nas propriedades mecânicas dos filmes.

Tabela 41: Propriedades mecânicas dos filmes protéicos a base de soro de leite formulados com e sem a adição de transglutaminase.

Tempo (min)	Com TG		Sem TG	
	Tensão na ruptura (MPa) ¹	Elongação (%) ¹	Tensão na ruptura (MPa) ¹	Elongação (%) ¹
0	1,9669±0,0090 ^{ab}	48,51±1,25 ^d	1,8944±0,0176 ^{ab}	44,78±3,28 ^{de}
60	2,2285±0,0490 ^{ab}	48,55±0,49 ^d	1,8921±0,0200 ^{ab}	38,99±0,71 ^{ef}
120	2,5254±0,1236 ^{bc}	76,47±1,87 ^g	1,6413±0,0521 ^a	35,91±1,29 ^{eh}
180	3,0752±0,3201 ^c	72,52±0,62 ^g	1,9987±0,0646 ^{ab}	32,49±0,96 ^{fi}
240	1,8200±0,0180 ^a	90,71±0,35 ^j	1,7647±0,1039 ^a	29,52±0,93 ⁱ

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

A transglutaminase promoveu a formação de filmes com uma matriz protéica mais estável em função do tempo de reação, aumentando a tensão na ruptura até 180 minutos (Figura 28), ou seja a energia de ligação entre as cadeias protéicas aumentou através da ação da enzima, indicando a formação de um maior número de ligações covalentes. A tensão na ruptura em filmes obtidos sem a enzima foi menor quando comparada ao valor dos filmes obtidos com a presença, e não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de reação, concluindo que a matriz filmogênica foi formada por ligações de menor energia entre as cadeias de proteínas parcialmente desnaturadas, ou seja, interações hidrofóbicas e iônicas, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals.

Os filmes apresentaram maior elasticidade à medida que ocorria a reação com transglutaminase, ou seja, a porcentagem de alongação aumentou proporcionalmente com o tempo de reação cruzada (Figura 29), promovendo maior flexibilidade, ao contrário dos filmes sem transglutaminase que tenderam a diminuir a porcentagem de alongação com o tempo de reação, indicando a necessidade de uma menor energia para romper os filmes, confirmando a formação de uma matriz com ligações de menor energia. É importante ressaltar que moléculas de água podem atuar como plastificante na matriz filmogênica, e a natureza hidrofílica da proteína, do glicerol, adicionada à higroscopicidade da lactose, pode também ter influenciado no aumento da porcentagem de alongação.

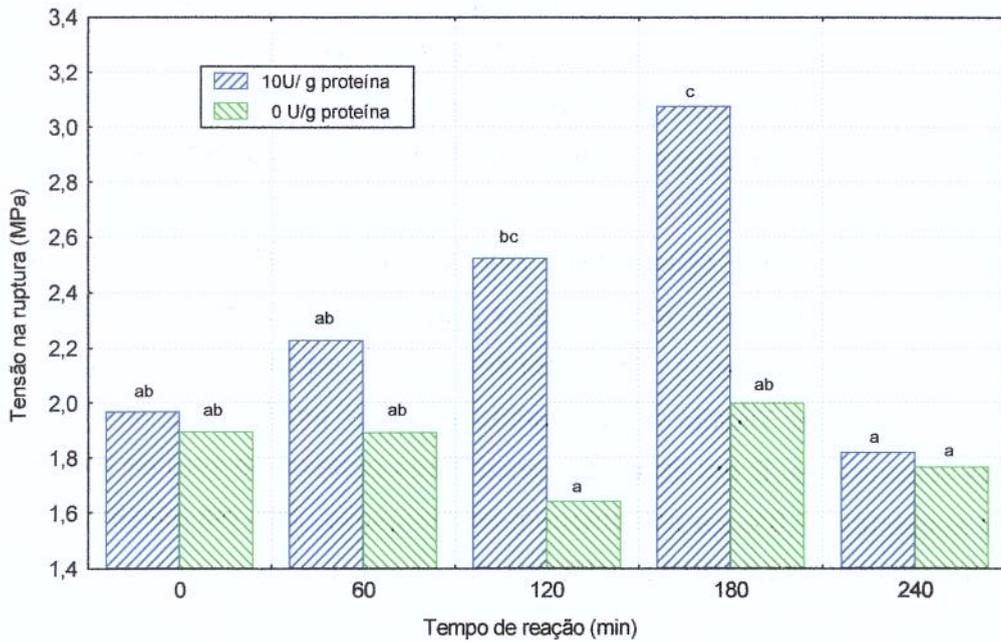


Figura 28: Tensão na ruptura dos filmes protéicos a base de soro de leite, com e sem adição de transglutaminase, em função do tempo de reação.

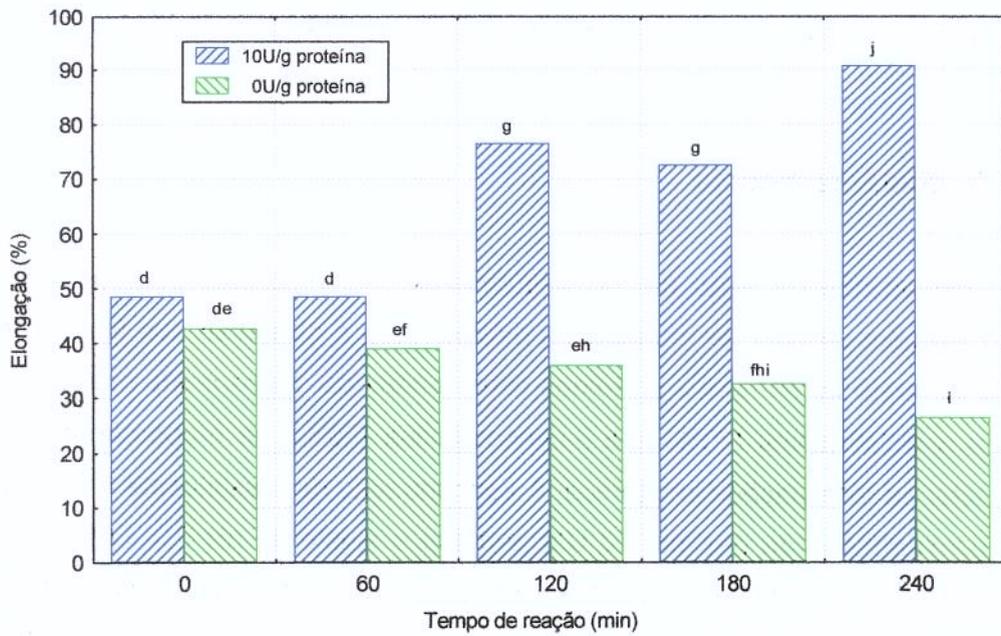


Figura 29: Elongação dos filmes protéicos a base de soro de leite, com e sem adição de transglutaminase, em função do tempo de reação.

O melhor tempo de incubação foi de 180 minutos, a 50°C, formando filmes com maior tensão na ruptura e porcentagem de alongação, caracterizando uma matriz mais estável e com maior capacidade de estender, representada por um maior número de ligações covalentes isopeptídicas entre as cadeias de proteínas do soro de leite.

Motoki et al. (1987) observaram uma tensão na ruptura e porcentagem de alongação duas vezes maior em filmes a base de α_{S1} -caseína catalisados pela transglutaminase, em relação a filmes obtidos sem a adição da enzima. O mesmo resultado foi obtido por Yildirim & Hettiarachchy (1998) em filmes a base de isolado protéico de soro de leite. E em filmes de concentrado protéico de soro de leite, a tensão na ruptura aumentou 17,0% e a porcentagem de alongação, 38% em relação a filmes não catalisados com a enzima (Li & Chen, 1999).

Desta forma, os filmes protéicos de soro de leite obtidos pela ação da enzima transglutaminase apresentaram melhores propriedades de barreira a umidade, mecânicas e solubilidade protéica após 180 minutos de reação cruzada pela transglutaminase, na formulação específica trabalhada, ou seja, adicionando 10U/g proteína em filmes contendo 6,5% de proteínas do soro de leite, 3,0% de glicerol em pH 7,0.

7.3 - Sistema Modelo

O mecanismo de ação da transglutaminase nas proteínas do soro de leite foi estudado também através de um sistema modelo para a obtenção dos filmes protéicos utilizando somente as principais proteínas constituintes do concentrado protéico de soro de leite, a α -lactalbumina (20%) e a β -lactoglobulina (50%), na proporção de 6,5% de proteína total na formulação filmogênica. A concentração de plastificante foi mantida em 3,0%, a concentração de enzima, 10 U/g proteína e ajuste do pH 7,0. O filme controle consistiu nestas mesmas concentrações, sem a adição da enzima. O tempo de reação adotado foi 180 minutos à temperatura de 50°C. E, à título de comparação, outra formulação foi feita sem a adição da enzima e contendo lactose e dextrina, em proporções equivalentes a formulação contendo 10U/ g proteína. As avaliações dos filmes quanto ao teor de proteína, teor de umidade, solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água,

tensão na ruptura e porcentagem de alongação estão apresentadas na Tabela 42, representadas pelo valor médio e o respectivo desvio padrão.

Tabela 42: Caracterização dos filmes obtidos pelo sistema modelo (α -la e β -lg) com e sem a adição de transglutaminase (TG).

Características	Sistema modelo		
	Com TG	Sem TG	Sem TG lactose+dextrina
Teor de proteína (%)	54,74±0,56	57,02±0,54	51,96±0,08
Teor de umidade (%)	24,47±0,12	22,39±0,28	25,12±0,19
Solubilidade protéica (%)	1,7590±0,1184 ^a	1,0861±0,0246 ^b	0,9116±0,0819 ^b
Permeabilidade (gmm/hm ² kPa)	0,2746±0,0061 ^c	0,3360±0,0049 ^d	0,3511±0,0147 ^d
Tensão na ruptura (MPa)	1,7193±0,0689 ^e	1,4114±0,0305 ^f	1,1276±0,0735 ^g
Elongação (%)	76,08±3,57 ^h	39,87±0,18 ⁱ	17,98±1,27 ^j
Espessura média (mm)	0,008±0,006	0,077±0,005	0,081±0,005

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

As características finais dos filmes de α -la e β -lg com e sem a adição da enzima confirmaram os resultados obtidos anteriormente com concentrado protéico de soro de leite. A solubilidade protéica aumentou a adição da enzima, mas o menor valor encontrado foi em filmes contendo somente lactose e dextrina. O oposto ocorreu para a permeabilidade ao vapor d'água, que diminuiu indicando a formação de uma rede mais compacta com menor número de poros. Apesar da solubilidade protéica ter sido menor em filmes sem enzima, a ação da transglutaminase pôde ser verificada através da permeabilidade ao vapor d'água, onde se formou um maior número de ligações entre as cadeias de proteína, diminuindo a difusividade da molécula de água através dos filmes, aumentando a barreira a umidade. A tensão na ruptura e a porcentagem de alongação aumentaram em formulações com enzima.

7.4 - Eletroforese e Exclusão Molecular

A formação das ligações covalentes inter e intramoleculares entre as cadeias protéicas obtidas pela reação cruzada com a enzima foi analisada por eletroforese SDS-PAGE e por exclusão molecular (HPLC), visando identificar a formação de um polímero de maior peso molecular em consequência da ação da transglutaminase.

7.4.1 - Efeito da concentração de enzima

A Figura 30 apresenta o perfil eletroforético dos filmes protéicos obtidos a partir da reação com diferentes concentrações de transglutaminase (faixa de 0 a 50U/g proteína).

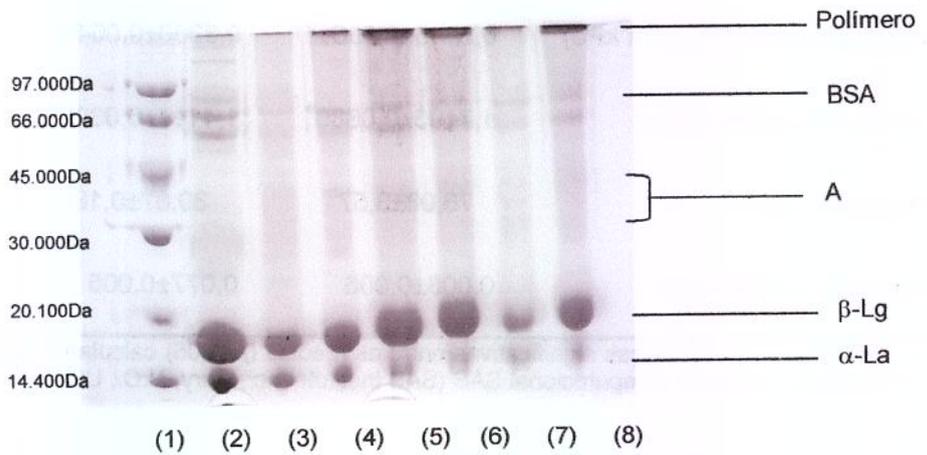


Figura 30: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da polimerização das proteínas do soro de leite catalisadas pela transglutaminase sob diferentes concentrações de enzima (U/g proteína) na obtenção de filmes protéicos: (1) padrão; (2) CPS; (3) 0UTG; (4) 10UTG; (5) 20UTG; (6) 30UTG; (7) 40UTG, (8) 50UTG.

A intensidade da banda do monômero de α -la diminuiu com o aumento da concentração de enzima (linhas (3) a (8)), e em menor intensidade a banda da β -lg, aparecendo uma nova banda no topo do gel de separação (maior peso molecular), intensificando com o aumento da quantidade de enzima adicionada. Ou seja, o perfil mostra frações monoméricas de α -la e β -lg diminuindo, e uma fração polimérica de maior

peso molecular aparecendo, da qual não entrou no gel de separação. Uma vez que o preparo das amostras para aplicação nos géis, continha β -mercaptoetanol (agente redutor), este polímero detectado não pode ter sido formado por ligações dissulfídicas. Então a matriz protéica foi estabilizada por ligações covalentes isopeptídicas ϵ -(γ -glutamil)lisina.

As bandas formadas entre as marcas do padrão 20100 e 45000Da (A), com intensidade fraca, podem estar associadas à formação de dímeros de α -la e β -lg, que não apareceram nas frações do concentrado protéico de soro de leite (CPS). A matriz filmogênica foi formada principalmente pelas proteínas α -la e β -lg (heterólogos e homólogos), observado pela diminuição nas bandas correspondentes, e não foi verificada a participação da BSA, pois a intensidade de sua banda permaneceu igual em todos os ensaios.

Han & Damodaran (1996) obtiveram um perfil eletroforético semelhante para a reação das proteínas α -la e β -lg puras pela ação de transglutaminase microbiana, formando dímeros e um polímero de maior peso molecular que não penetrava no gel de separação, assim como Færgemand et al. (1997); Motoki & Nio (1983). LIM et al. (1999) concluíram que este polímero é resultado da formação de agregados protéicos de alto peso molecular. Babiker et al. (1996) também observaram em proteínas de soja modificada com TG e Motoki et al. (1987) com α_{S1} -caseína.

As soluções filmogênicas também foram analisadas através do processo de exclusão molecular (HPLC) para obter maiores informações sobre o efeito da reação catalisada pela transglutaminase. Os padrões utilizados foram as proteínas purificadas α -la, β -lg, BSA e concentrado protéico de soro de leite. Os tempos de retenção para as proteínas α -la e β -lg e BSA, foram respectivamente 9,1; 8,8 e 8,1 minutos. A Figura 31 apresenta o perfil cromatográfico do concentrado protéico de soro de leite. Através da comparação com o perfil cromatográfico das proteínas puras (α -la, β -lg e BSA) e o estudo de Bican & Blanc (1982) e Morr (1985), os picos encontrados, para cada tempo de retenção, durante a exclusão molecular do CPS correspondem a: (1), (2) e (3) imunoglobulinas; (4) BSA; (5) β -lactoglobulina e (6) α -lactalbumina.

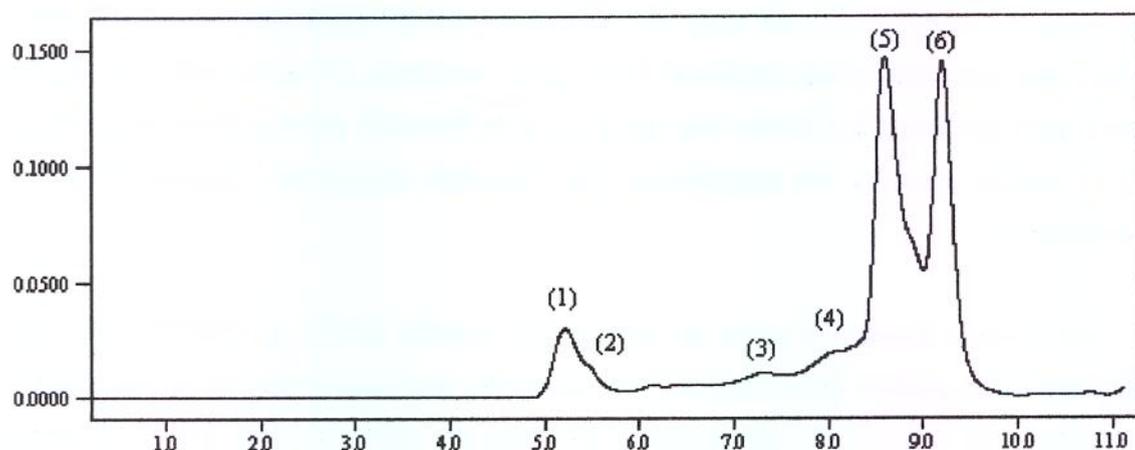


Figura 31: Perfil cromatográfico do concentrado protéico do soro de leite.

O perfil cromatográfico das amostras de filmes obtidos em diferentes concentrações de enzima está apresentado na Figura 32, confirmando a formação de um polímero de maior peso molecular através do pico (1) e o consumo principalmente da α -la (3), em função do aumento da concentração de transglutaminase. Na concentração de 30U/g proteína, ocorreu a maior área do pico referente ao polímero de maior peso molecular, e em concentrações de 40 e 50U/g proteína a enzima perdeu sua atividade, formando cada vez menos polímero, e conseqüentemente consumindo menos as proteínas α -la e β -lg.

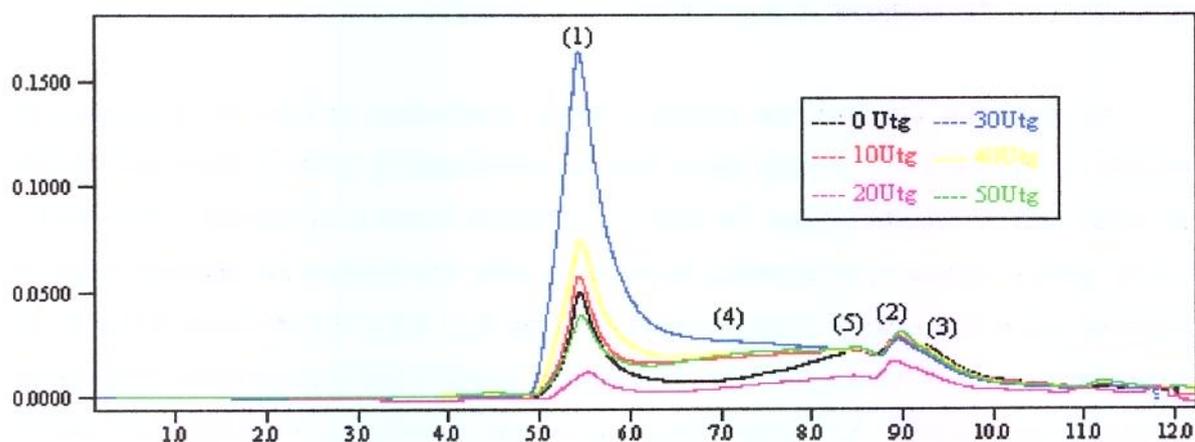


Figura 32: Perfis cromatográficos do efeito da concentração de transglutaminase na reação cruzada das proteínas do soro de leite na obtenção de filmes protéicos: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.

Para uma melhor visualização, os perfis cromatográficos das formulações contendo 0 e 30U/g proteína foram separados e apresentados na Figura 33.

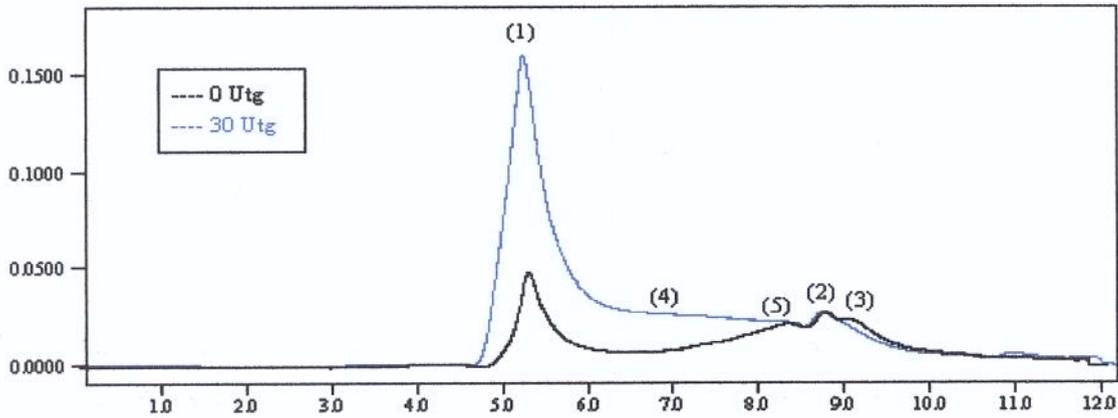


Figura 33: Perfis cromatográficos do efeito da concentração de transglutaminase na reação cruzada das proteínas do soro de leite na obtenção de filmes protéicos, com a adição de 0 e 30U/g proteína: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.

O aparecimento de uma área (4) proporcional à concentração de enzima adicionada, entre os tempos de retenção 6,0 e 8,0, pode estar associada à formação de polímeros com diferentes pesos moleculares, e não foi possível uma separação, ou seja, a formação de picos definidos, com a coluna e condições trabalhadas no processo de exclusão molecular. Supõe-se como explicação deste resultado a formação de polímeros de pesos moleculares muito próximos e em pequenas quantidades. Deve-se ressaltar que apresentam peso molecular maior que o da proteína BSA (66.000Da).

Færgemand et al. (1997) avaliaram a porcentagem de α -la e β -lg que permaneceram na solução sob a forma nativa após a reação com transglutaminase, observando uma maior redução da α -la, associada a uma estrutura com resíduos de glutamina e lisina mais acessíveis para a reação cruzada com a enzima, enquanto que a β -lg caracterizou-se por uma menor reatividade dos resíduos. Segundo Han & Damodaran (1996), a taxa de reação cruzada da β -lg é muito menor que a da α -la.

Os perfis eletroforético e cromatográfico confirmaram os resultados obtidos na caracterização dos filmes protéicos formados pela catálise com diferentes concentrações de transglutaminase, indicando a formação de uma matriz polimérica com maior número de ligações entre as cadeias de proteínas (diminuição da intensidade das bandas e área dos picos das proteínas α -la e β -lg, aparecimento de uma banda e pico referente a um polímero de maior peso molecular), reduzindo a permeabilidade ao vapor d'água e aumentando a tensão na ruptura e porcentagem de alongação. A formação de possíveis dímeros (banda A) e monômeros protéicos que não participaram da rede protéica, estão relacionados ao aumento da solubilidade protéica dos filmes.

A escolha da melhor concentração deve ser feita não só pela quantidade de polímero de maior peso molecular formado, mas também pelas melhores propriedades (barreira e mecânica) obtidas pelos filmes, assim como a aparência e manuseio dos mesmos. A concentração de 10U/ g proteína pode ser considerada a que melhor representou a obtenção de filmes protéicos à base de soro de leite, nas condições trabalhadas neste estudo, uma vez que em concentrações maiores que 30U/g proteína, os filmes alteraram seu aspecto físico quando submetidos a altos valores de umidades relativa.

7.4.2 - Efeito de tempo de reação

O efeito do tempo de reação cruzada na obtenção dos filmes protéicos a base de soro de leite foi avaliado, e seu perfil eletroforético está representado na Figura 34. A formulação filmogênica constava da adição da concentração de transglutaminase de 10U/g proteína em 6,5% de proteína, 3,0% de glicerol em pH 7,0, e os tempos avaliados foram 0, 60, 120, 180 e 240 minutos. Observou-se o aparecimento do polímero de maior peso molecular, relacionado à formação da matriz filmogênica através de ligações covalentes isopeptídicas obtidas através da ação da transglutaminase. Uma redução parcial na intensidade das bandas de α -la e β -lg foi constatada até 180 minutos de reação. E, novamente ocorreu o aparecimento de uma região correspondente a dímeros das proteínas α - la e β -lg.

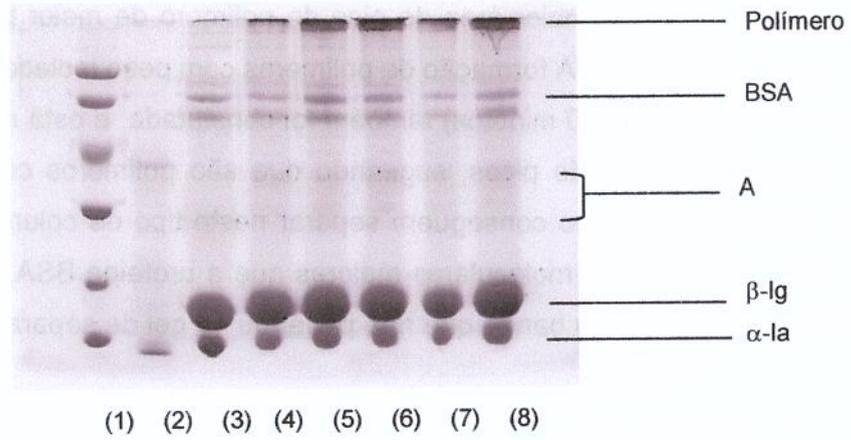


Figura 34: SDS-PAGE da reação da transglutaminase com as proteínas do soro de leite na obtenção de filmes protéicos em função do tempo de reação: (1) padrão; (2) enzima TG; (3) CPS; (4) 0 min; (5) 60 min; (6) 120 min; (7) 180 min; (8) 240 min.

Estes resultados foram comparados com o perfil cromatográfico da reação cruzada com a transglutaminase, em função do tempo (Figura 35), confirmando a formação do polímero de maior peso molecular (1), no tempo de eluição de aproximadamente $t \cong 5,2$ min, e o consumo das proteínas β -lg (2) e α -la (3), associado à diminuição gradativa das áreas dos picos correspondentes.

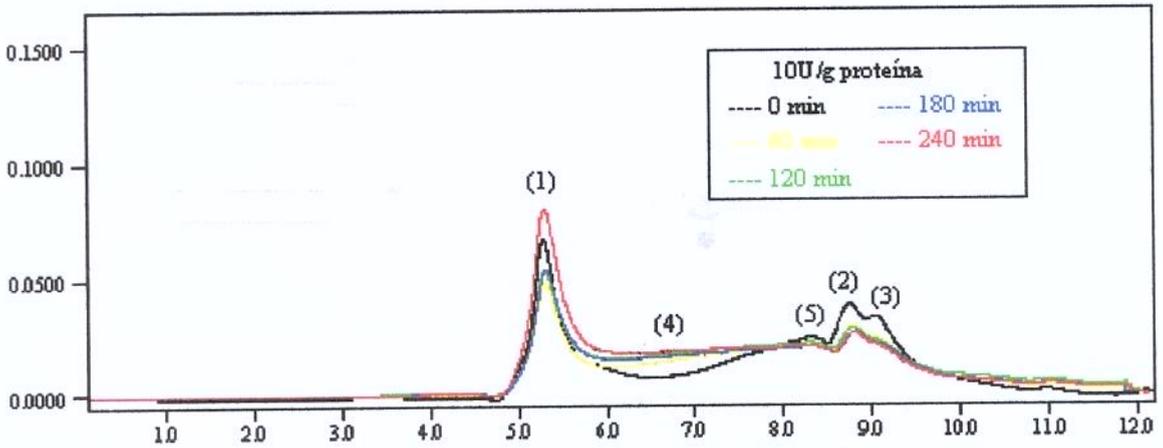


Figura 35: Perfil cromatográfico do efeito do tempo de reação na formação de filmes protéicos a base de soro de leite através da catálise com transglutaminase: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.

A obtenção da maior área de pico do polímero de maior peso molecular foi aos 240 minutos de reação. A formação de polímeros com peso molecular intermediário (faixa de tempo entre 6,0 a 8,0 minutos) também foi constatada, e está representada pela área (4), sem identificação de picos, sugerindo que são polímeros com pesos moleculares muito próximos, que não conseguem separar neste tipo de coluna utilizada. Lembrando que apresentam pesos moleculares maiores que a proteína BSA, identificados no perfil eletroforético através da banda que não penetrou no gel de separação.

A título de comparação, o perfil eletroforético dos filmes obtidos sem a adição de transglutaminase está representado na Figura 36, indicando o não aparecimento da banda referente a um polímero de maior peso molecular, e as bandas dos dímeros das proteínas α -la e β -lg (A) apresentaram intensidade muito baixa. A diminuição na intensidade das bandas destas proteínas não foi perceptível. Deve-se ressaltar que, houve a obtenção de filmes com baixas propriedades mecânicas, e a formação da matriz filmogênica foi associada a ligações de baixa energia entre proteínas parcialmente desnaturadas durante os tratamentos térmicos aplicados nas soluções, como discutido anteriormente.

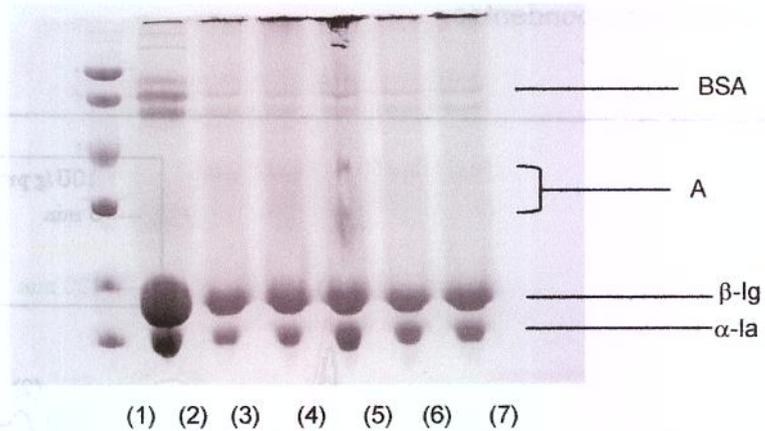


Figura 36: Perfil eletroforético da reação para a obtenção de filmes protéicos a base de soro de leite sem a adição da enzima transglutaminase: (1) padrão; (2) CPS; (3) 0 min; (4) 60 min; (5) 120 min; (6) 180 min; (7) 240 min.

O cromatograma referente a este processo (sem TG) em função do tempo de reação pode ser analisado na Figura 37. O pico referente ao polímero de maior peso molecular ($t \cong 5,5$ min) apareceu na reação sem a adição da transglutaminase,

representando a matriz protéica que representa a formação de filmes por ligações entre as cadeias de proteínas parcialmente desnaturadas pelos tratamentos térmicos aplicados durante o processo.

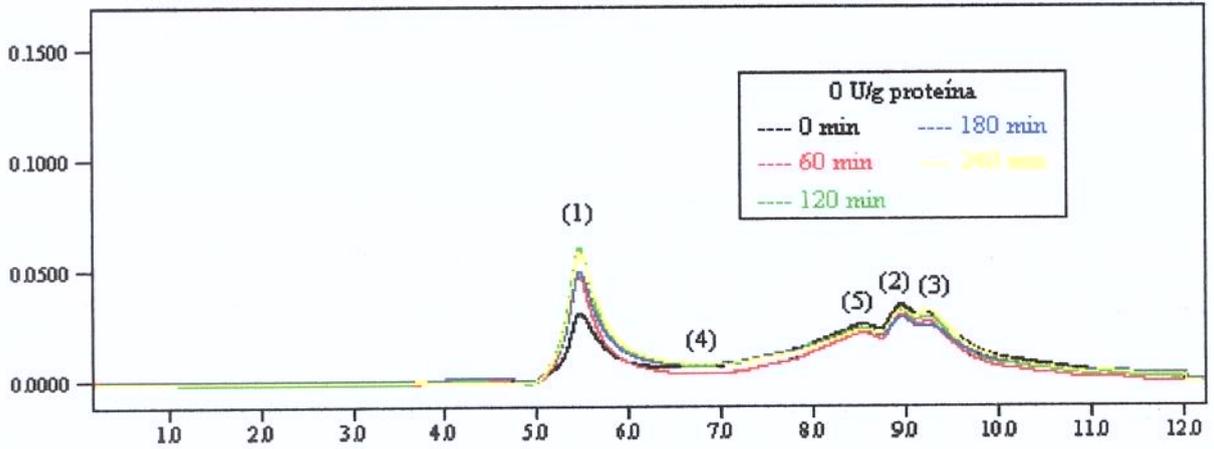


Figura 37: Perfil cromatográfico do efeito do tempo de reação na formação de filmes protéicos a base de soro de leite na ausência da enzima transglutaminase: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.

Para uma melhor visualização, os perfis cromatográficos obtidos para o tempo de reação de 240 minutos, com a presença e ausência da enzima transglutaminase, estão apresentados na Figura 38.

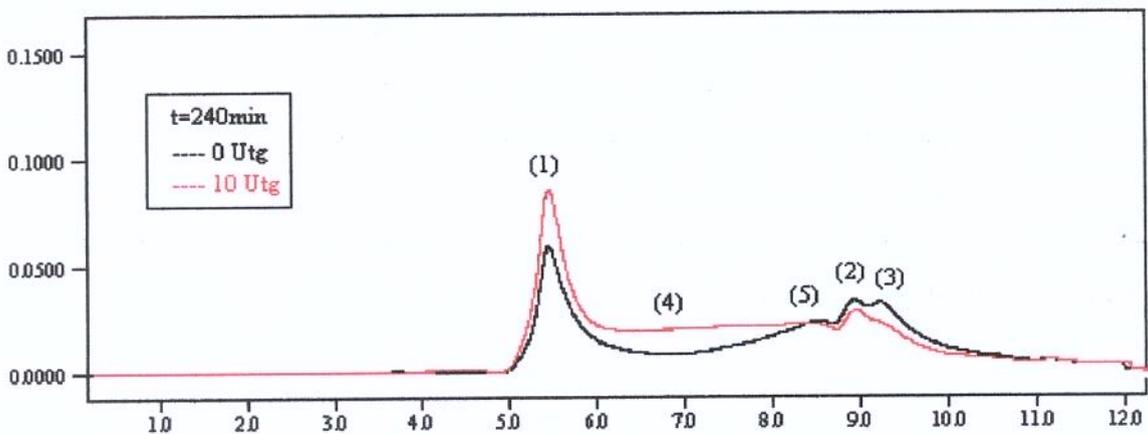


Figura 38: Perfil cromatográfico do efeito da adição de transglutaminase em filmes protéicos a base de soro de leite: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.

As diferenças encontradas entre os perfis cromatográficos da reação com presença e ausência da transglutaminase foram: não aparecimento da área intermediária (entre $t=5,5$ e $8,0\text{min}$) referente a polímeros com diferentes pesos moleculares (4), o consumo das proteínas α -la e β -lg foi pequeno e similar e uma menor área do pico referente ao polímero de maior peso molecular.

Através dos perfis eletroforéticos e cromatográficos obtidos no estudo do efeito do tempo de reação com transglutaminase, pode-se confirmar os resultados da caracterização dos filmes protéicos a base de soro de leite, onde a presença da enzima provocou a formação de um maior número de ligações intermoleculares entre as proteínas α -la e β -lg (aparecimento da banda e pico referente a um polímero de maior peso molecular, redução na intensidade das bandas das proteínas), promovendo uma melhor propriedade de barreira à umidade e filmes com maior tensão na ruptura e porcentagem de alongação. Aboumahmoud & Savello (1990) estudaram a reação de catálise com transglutaminase nas proteínas α -la e β -lg purificadas em função do tempo de reação, observando o aumento na formação de um polímero até 4 horas de incubação, em condições ótimas de processo.

7.4.3 - Sistema modelo

O perfil eletroforético do sistema modelo, ou seja, da reação de transglutaminase com as proteínas α -la e β -lg, na obtenção de filmes protéicos, está apresentado na Figura 39. A intensidade das bandas de α -la e β -lg diminuiu com a adição de transglutaminase, formando uma banda de um polímero de maior peso molecular, e de um dímero de β -lg, confirmando os resultados obtidos na reação cruzada com filmes obtidos com concentrado protéico de soro de leite.

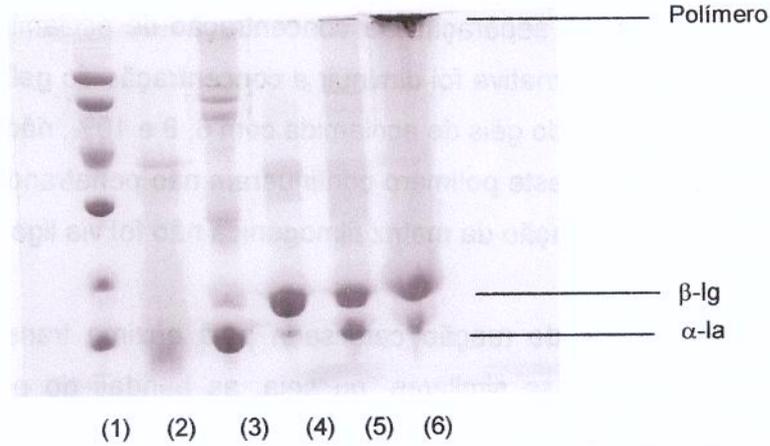


Figura 39: Perfil eletroforético do sistema modelo (α -la e β -lg) na obtenção de filmes através da catálise com TG: (1) padrão; (2) enzima TG; (3) α -la; (4) β -lg; (5) 0U; (6) 10U.

Através da comparação do perfil eletroforético e cromatográfico (Figura 40), observou-se a formação de um pico referente a um polímero com maior peso molecular (1) e a área referente a polímeros com diferentes pesos moleculares (4), assim como o consumo das proteínas α -la e β -lg (diminuição da área dos picos).

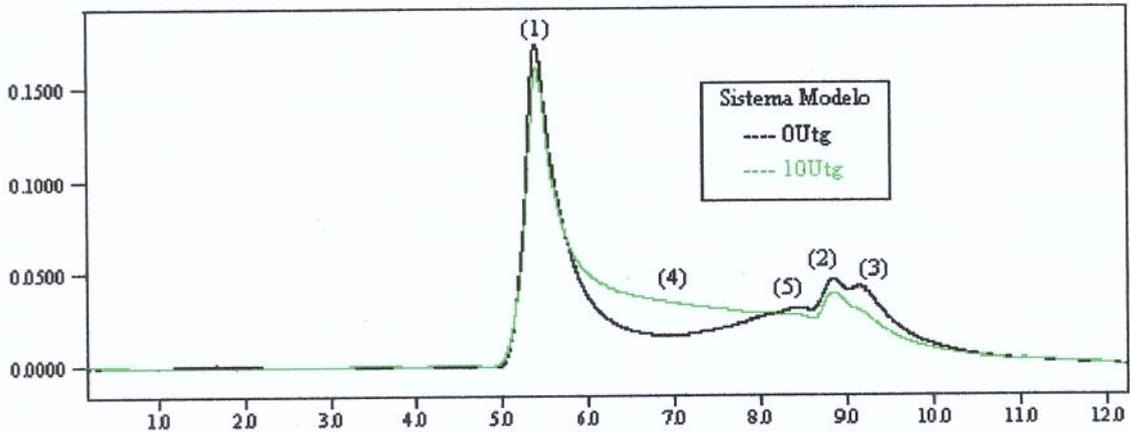


Figura 40: Perfil cromatográfico da reação de transglutaminase com as principais proteínas do soro de leite (α -la e β -lg) em sistema modelo: (1) polímero; (2) β -lg; (3) α -la; (4) polímeros com diferentes pesos moleculares; (5) BSA.

A formação de um polímero com maior peso molecular e frações poliméricas com diferentes pesos moleculares foi verificada pelo método de exclusão molecular e através da análise do perfil eletroforético. A banda referente ao polímero de maior peso molecular

não penetrou no gel de separação na concentração de acrilamida trabalhada (12% de acrilamida), assim a alternativa foi diminuir a concentração do gel de separação. Ensaio foram realizados utilizando géis de acrilamida com 6, 8 e 10%, não obtendo êxito, ou seja, as bandas referentes a este polímero continuaram não penetrando no gel de separação, confirmando que a formação da matriz filmogênica não foi via ligações dissulfídicas.

Outros estudos de reação catalisada pela enzima transglutaminase obtiveram resultados de eletroforese similares, ou seja, as bandas do polímero de maior peso molecular não penetraram no gel de separação, tais como em filmes a base de gelatina (Lim et al., 1999); em filmes de clara de ovo (Lim et al., 1998); proteínas de isolado protéico de soro de leite (Yildirim et al., 1996); em proteínas α -la, β -lg e BSA (Han & Damodaran, 1996); em proteínas do soro de leite (Aboumahmoud & Savello, 1990); em proteínas de caseína e β -lg (Motoki & Nio, 1983; Ikura et al., 1980). O preparo das amostras no processo SDS-PAGE inclui a adição de β -mercaptoetanol, que exclui a possibilidade deste polímero de maior peso molecular ter sido formado por ligações dissulfídicas (Færgemand et al., 1997; Nonaka et al., 1989 e Motoki & Nio, 1983).

Um experimento foi desenvolvido para verificar se este polímero de alto peso molecular, que não penetrou no gel de separação, é um composto protéico. O procedimento consistiu em aplicar em um gel de poliacrilamida com 12% de concentração, somente a amostra do filme formado com 30U/g proteína (correspondente a canaleta (6) da Figura 30) nas oito canaletas centrais. Após a aplicação da corrente elétrica (final da corrida), o gel foi cortado na parte superior, próximo à posição da banda deste polímero, sem corar. Em seguida, este pedaço de gel foi macerado em um pequeno volume de água destilada e determinou-se o teor de proteína pelo Método de Lowry (método com alta sensibilidade). O resultado obtido foi de 4,66mg de proteína na solução aquosa. Desta solução, foram preparadas amostras com β -mercaptoetanol e aplicadas em diferentes concentrações em um gel de poliacrilamida de menor concentração (8%), ou seja, mais poroso, permitindo a penetração de polímeros de maior peso molecular, como mostra a Figura 41.

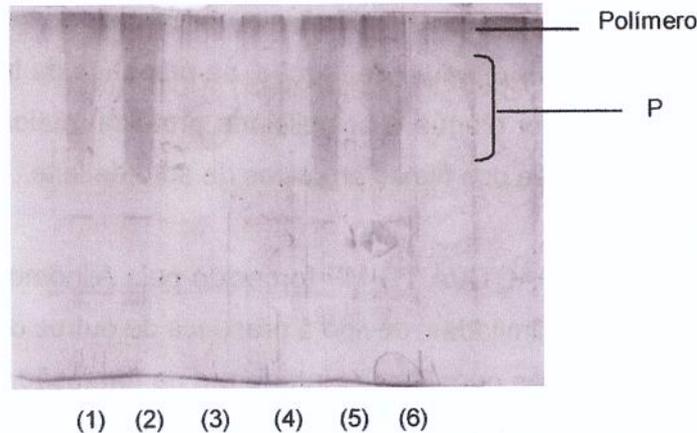


Figura 41: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da amostra contendo o polímero de alto peso molecular sob diferentes concentrações: (1) e (2) 6,6mg proteína; (3) e (4) 1,9mg proteína; (5) e (6) 4,7mg proteína.

Este gel foi corado primeiramente com o corante a base de Comassie Blue, não obtendo resultado, devido à baixa concentração de proteína nas amostras aplicadas. Um outro corante a base de nitrato de prata e DTT (ditiotretitol) foi utilizado, e segundo a literatura é 5 vezes mais sensível. Os géis com este corante ficaram mais escuros, mas foi possível visualizar as bandas referentes ao polímero de alto peso molecular. A faixa (P) corresponde a polímeros de diferentes pesos moleculares em quantidade pequenas, insuficientes para definir uma banda, este fenômeno também foi verificado nos perfis cromatográficos. Desta forma, pode-se afirmar que o polímero encontrado nos perfis eletroforético e que não penetram no gel é um composto protéico de alto peso molecular e não formado por ligações dissulfídicas.

7.5 - Conclusões Parciais

A catálise pela transglutaminase promoveu ligações covalentes isopeptídicas entre as cadeias das proteínas do soro de leite, formando uma matriz polimérica, ou filme protéico, com melhores propriedades de barreira e mecânicas. A melhor concentração de transglutaminase foi de 10U/g proteína em filmes contendo 6,5% de proteína, 3,0% plastificante (glicerol) e pH 7,0. O aumento na concentração de enzima reduziu os valores de permeabilidade de água dos filmes, aumentou a tensão na ruptura e porcentagem de elongação, mas provocou o aumento da solubilidade protéica. O tempo de reação que

promoveu a formação de filmes com melhores propriedades de barreira e mecânica foi de 180 minutos. Quanto maior o tempo de reação, na presença de transglutaminase, menor a permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade protéica, maior a tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos de soro de leite.

O uso do produto ACTIVA TG-MP fornecido pela Ajinomoto Interamericana Co. é viável em concentrações limitadas, devido à presença de outros compostos, como lactose e dextrina, que em grandes quantidades interferem na formação de uma matriz estável e homogênea de filmes protéicos. A concentração ideal encontrada neste estudo foi de 10UTG/g proteína. A alta concentração de lactose na formulação filmogênica influenciou as propriedades de barreira e mecânicas dos filmes, impedindo a formação de uma matriz filmogênica contínua e com maior número de ligações inter e intramoleculares.

O perfil eletroforético e cromatográfico da reação da transglutaminase em várias concentrações de enzima e tempo de reação indicaram a formação de polímeros de maior e diferentes pesos moleculares, relacionado à ação da enzima promovendo ligações covalentes isopeptídicas entre as proteínas do soro de leite.

O uso de agentes redutores, como DTT promoveu rendimentos maiores na reação da transglutaminase com proteínas de soro de leite, segundo o estudo realizado por Færgemand et al. (1997), concluindo que a α -la e β -lg reagiram com maior intensidade quando submetidas a uma pré-desnaturação parcial. Mas, este trabalho optou por não adicionar produtos tóxicos e não aceitos pela legislação em alimentos.

CAPÍTULO 8

8 - Aplicação de Filmes Protéicos a Base de Soro de Leite

8.1 - Filmes Protéico de Soro de Leite

A utilização de um filme como embalagem envolve propriedades mecânicas para um bom manuseio e transporte, o prolongamento do tempo de armazenamento, mantendo as características iniciais do produto, e a aceitação do consumidor, que está diretamente relacionada com o aspecto visual e nutritivo.

Os filmes protéicos a base de soro de leite foram obtidos através de três procedimentos distintos, por desnaturação térmica, com a incorporação de ácido esteárico e por modificação enzimática utilizando a transglutaminase microbiana, a partir de uma formulação básica de 6,50% de proteína, 3,0% de plastificante (glicerol) e pH 7,0. A aplicação consistiu em comparar os resultados finais das principais propriedades (permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação) destes filmes com uma situação real. A Tabela 43 resume as características finais dos filmes protéicos, obtidos a partir da melhor formulação definida nas etapas anteriores através de diferentes processos: desnaturação térmica, filme padrão (FP); com incorporação de um composto hidrofóbico, filme emulsionado (FEM) contendo 0,5% de ácido esteárico; e por modificação enzimática, filme catalisado com transglutaminase (FTG) na concentração de 10U/g proteína, incubada por 180 minutos.

Tabela 43: Características finais dos diferentes tipos de filmes protéicos de soro de leite.

Tipo de filme	Solubilidade protéica (%)	Permeabilidade ao vapor d'água	Tensão na ruptura (MPa)	Elongação (%)
FP	0,7415	0,3023	2,5558	68,04
FEM	0,7025	0,2680	2,2500	44,80
FTG	0,8818	0,2705	3,0752	72,52

O aspecto visual está relacionado com a cor e transparência final dos filmes protéicos, e foi avaliado através da variação de cor e opacidade entre os três tipos de filme, medidos no colorímetro Hunterlab, sendo L^* , o índice de luminosidade, variando de branco ($-L^*$) para preto ($-L^*$); a^* , o índice de croma com as coordenadas de verde ($-a^*$) para vermelho ($+a^*$), b^* ; o índice de croma com as coordenadas de azul ($-b^*$) para amarelo ($+b^*$) e ΔE , a diferença total de cor dos filmes em relação ao filme padrão, calculada pela equação Eq.(61). A Tabela 44 apresenta os parâmetros de cor, opacidade e a diferença total de cor determinados e calculados para os filmes padrão (FP), filme emulsionado (FEM) e filme catalisado pela transglutaminase (FTG).

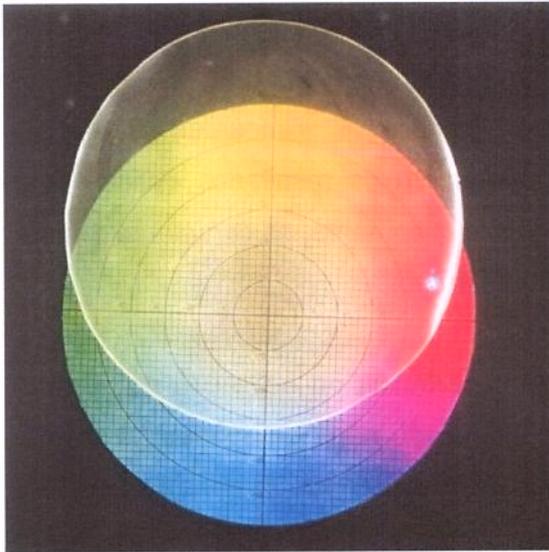
$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L^*_O)^2 + (a^* - a^*_O)^2 + (b^* - b^*_O)^2} \quad (\text{Eq. 59})$$

Tabela 44: Parâmetros de cor, opacidade com os respectivos desvios padrão dos filmes protéicos de soro de leite, formulados por diferentes processos.

Tipo de Filme	L^*	a^*	b^*	Opacidade	ΔE
FP	84,62±0,17 ^a	-0,91±0,02 ^b	10,52±0,50 ^e	19,99±0,15 ^g	—
FEM	83,68±0,35 ^a	-0,68±0,02 ^c	18,54±0,81 ^f	31,27±0,62 ^h	8,08
FTG	85,26±0,23 ^a	-0,98±0,04 ^d	10,17±0,57 ^e	19,71±0,40 ^g	0,73

a, b, c, d, e, f, g, h – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

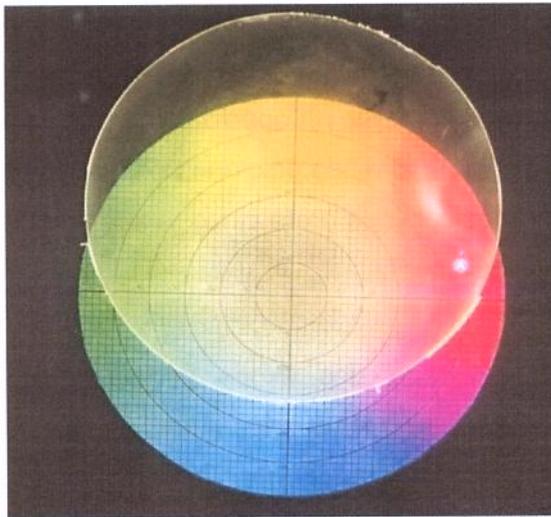
Filmes emulsionados apresentaram uma diferença total de cor (ΔE) mais acentuada em relação ao filme padrão, relacionada à incorporação de lipídio, que promoveu um aumento na opacidade e no parâmetro b^* , e uma redução na luminosidade



a) FILME PADRÃO



b) FILME EMULSIONADO



c) FILME MODIFICADO COM TG

Figura 42: Filmes protéicos de soro de leite obtidos por diferentes procedimentos: a) filme padrão, b) filme emulsionado e c) filme TG.

Filmes emulsionados apresentaram uma diferença total de cor (ΔE) mais acentuada em relação ao filme padrão, relacionada à incorporação de lipídio, que promoveu um aumento na opacidade e no parâmetro b^* , e uma redução na luminosidade e do parâmetro a^* . Fazendo uma comparação visual, os filmes emulsionados apresentaram-se mais opacos e amarelos, que confirmam os resultados obtidos dos parâmetros de cor. Quanto aos filmes modificados enzimaticamente, as características de cor e opacidade foram similar às encontradas no filme padrão.

A opacidade é uma propriedade de grande importância na aplicação dos filmes como embalagem alimentícia e está associada à morfologia não homogênea da matriz filmogênica emulsionada, onde partículas lipídicas provocam uma luz visível que dispersa através do filme, causando a opacidade.

Kim & Ustunol (2001a) também obtiveram filmes de isolado protéico de soro de leite com maior opacidade quando se incorporou cera de candelila na formulação, assim como McHugh & Krochta (1994c) em filmes emulsionados de proteína de soro com diferentes tipos de ácidos graxos (ácido láurico, palmítico, esteárico e mirístico). Yang & Paulson (2000b) observaram um aumento na opacidade de filmes de gelana proporcional à concentração de ácido esteárico-palmítico adicionada. E Gallo *et al.* (2000) concluíram que filmes emulsionados de metilcelulose eram cinco vezes menos transparentes que os filmes controle (somente metilcelulose).

Outra característica estudada dos filmes protéicos de soro de leite foi a digestibilidade protéica, visando averiguar o valor nutritivo e a possibilidade de ser uma embalagem comestível. A metodologia *in vitro* agiliza os resultados de qualidade nutricional, e expressa a concentração de nitrogênio solúvel comparada com a concentração total de nitrogênio da amostra. O valor encontrado para filme protéico de soro de leite, com a formulação padrão foi de 93,97%; para filmes emulsionados, de 92,55% e para filmes modificados enzimaticamente, de 89,88%, concluindo que todos os filmes apresentaram uma digestibilidade elevada.

8.2 - Sistema de Embalagem

As metodologias de aplicação testadas para os filmes protéicos de soro de leite em produtos alimentícios foram baseadas nas características finais dos filmes (propriedades de barreira e mecânicas), ou seja, o objetivo foi constatar estas propriedades através do comportamento prático como embalagem em alimentos. Ensaio preliminares foram realizados aplicando os filmes protéicos sob diferentes maneiras, a embalagem (filme) selada à quente, coberturas protéicas (recobrimento de amostras) e o fechamento de um recipiente. A selagem em filmes protéicos a base de soro de leite não se manteve durante o processo, observando que em alta umidade relativa (75%), os filmes adsorviam umidade e tendiam a abrir os pontos de selagem, não garantindo a transferência de vapor d'água somente através das paredes da embalagem. Quanto à técnica de recobrimento, variações na perda de massa e teor de umidade, na mudança de cor e textura foram averiguadas, mas as diferenças eram pequenas para os produtos alimentícios estudados.

Segundo McHugh & Senesi (2000), coberturas em alimentos minimamente processados com alto teor de umidades é um procedimento desvantajoso, por necessitar de um maior tempo de secagem em temperatura ambiente, podendo desencadear previamente o processo detereorativo, resultando na perda de qualidade ou um menor tempo de vida-de-prateleira.

A aplicação dos filmes através do fechamento de um recipiente permitiu avaliar as principais propriedades dos filmes protéicos a base de soro de leite. Os filmes foram aplicados, fechando um recipiente plástico contendo cilindros de maçã, garantindo que a transferência de massa ocorresse somente através da superfície filmogênica. O sistema pode ser visualizado na Figura 43.

As maçãs foram cortadas em cilindros de 4,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura. A perda de umidade provoca o encolhimento e alterações na textura (crocância). A maçã é um fruto que após o corte, fica sujeito à ação da enzima polifenoxidase, e na presença de oxigênio, promove um escurecimento. Alimentos minimamente processados devem manter a consistência, aparência fresca, cor aceitável e ser razoavelmente livres de defeitos.

A avaliação visual é o fator de maior efeito na escolha de compra do consumidor, seguido da firmeza no toque, estando diretamente relacionados com a mudança de cor e perda ou ganho de umidade (Shewfelt, 1987).



Figura 43: Sistema de embalagem fechado com filmes protéicos de soro de leite contendo cilindros de maçã.

A propriedade de barreira ao vapor d'água dos filmes protéicos foi avaliada através de medidas de perda de peso, teor de umidade e variação na textura das maçãs em função do tempo de armazenamento. As propriedades mecânicas (tensão na ruptura e porcentagem de alongação) foram requeridas durante a aplicação dos filmes nos potes, pois a fragilidade não permitiu a total vedação do pote plástico, apresentando pontos de falhas, quebra após o fechamento. E a propriedade de barreira a gases foi controlada através do escurecimento enzimático dos pedaços de maçã, na presença de oxigênio, medida pela mudança nos parâmetros de cor.

Filmes protéicos de soro de leite apresentam boa barreira a oxigênio, segundo a literatura, e a avaliação da mudança de cor foi efetuada durante o armazenamento para conferir esta propriedade nas formulações trabalhadas, comparando-se o resultado em sistema aberto (potes sem tampa) e sistemas fechados com os diferentes tipos de filme com e sem a injeção de nitrogênio. Este gás foi injetado por um tempo pré-definido para a expulsão total do ar ambiente de dentro dos potes, visando comparar o comportamento das maçãs acondicionadas em sistemas fechados com os filmes, com e sem a redução da concentração de oxigênio.

É importante ressaltar que, neste estudo, não houve uma preocupação em determinar condições de armazenamento para a vida de prateleira de maçãs em pedaços, sendo que a escolha deste produto foi baseada na rápida deterioração (perda de umidade e escurecimento enzimático), o que permitiu a avaliação dos filmes atuando como barreira a umidade e gases, mantendo sua integridade durante o tempo de armazenamento.

Os potes foram armazenados na temperatura de 25°C e 75% de umidade relativa; referente à condição de determinação das propriedades dos filmes, facilitando a comparação dos resultados com a prática; e a 10°C, que é uma condição similar à da geladeira.

8.2.1 - Armazenamento em temperatura e umidade relativa controlada

As embalagens contendo os pedaços de maçã, em sistema aberto e em sistema fechado, com e sem a injeção de gás nitrogênio, foram acondicionadas em temperatura (25°C) e umidade relativa (75%) controladas. Estas condições estão relacionadas com a de determinação das propriedades dos filmes, uma vez que o objetivo foi verificar os resultados de barreira e propriedades mecânicas dos filmes de soro de leite.

A avaliação da permeabilidade ao vapor d'água foi feita através da perda de peso das amostras de maçã, o teor de umidade e a mudança de textura em função do tempo de acondicionamento. O comportamento das maçãs em sistema fechado com e sem a injeção de nitrogênio foi similar, assim as curvas representadas a seguir correspondem à média das duas medidas. Todas as determinações foram feitas em triplicata. A perda de peso das amostras de maçã em sistemas aberto e fechado com filme padrão (FP), emulsionado (FEM) e modificado enzimaticamente com transglutaminase (FTG) em função do tempo de armazenamento, pode ser avaliada na Figura 44.

Os filmes protéicos promoveram uma barreira à umidade quando comparados com o sistema aberto, não apresentando uma diferença significativa entre as diferentes formulações, mas observou-se que filmes emulsionados tenderam a perder menos

umidade que filmes padrão, associado à presença de um composto hidrofóbico na matriz filmogênica, que reduz a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes.

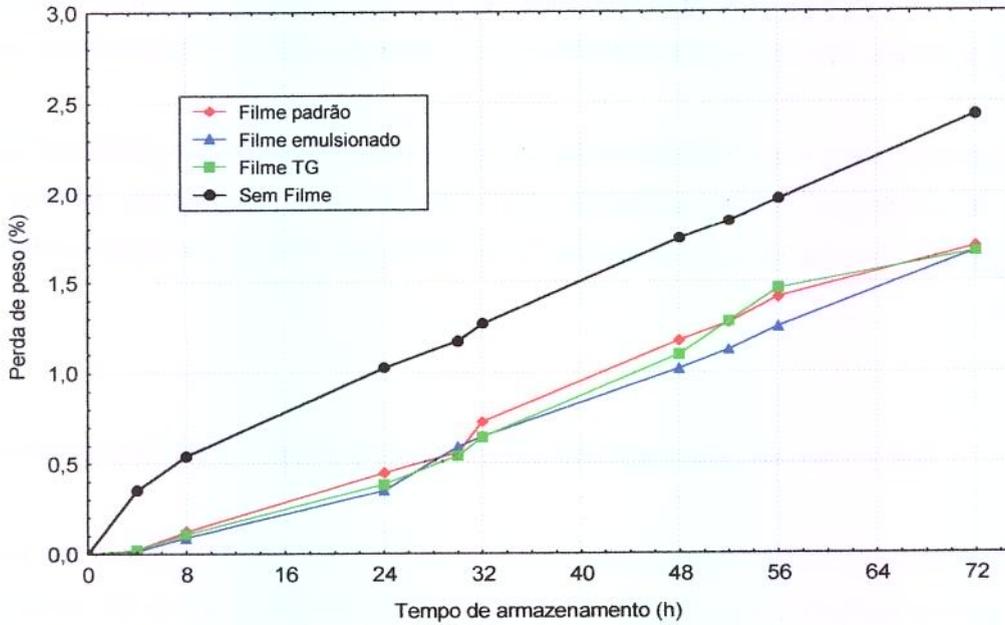


Figura 44: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas a 25°C e 75% de umidade relativa em sistema aberto e fechado com diferentes tipos de filmes protéicos de soro de leite.

A perda de peso dos pedaços de maçã foi gradual em todos os sistemas de embalagem trabalhados, como pode ser observado também na Tabela 45, resultando em uma perda de 2,43% após 72 horas de acondicionamento em sistema aberto; e em sistema fechado, os comportamentos com diferentes tipos de filmes foram muito similares, com uma perda de peso média de 1,68%, no mesmo período, não existindo diferença significativa entre os resultados no mesmo tempo de armazenamento. Quanto à transferência de umidade, os sistemas de embalagem fechada com os filmes protéicos de soro de leite aumentaram o tempo de armazenamento, ou seja, a perda de peso atingida em sistema fechado após 72h de armazenamento foi equivalente à perda de peso em sistema aberto atingida após aproximadamente 40h de armazenamento.

Tabela 45: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas em sistemas de embalagem aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite a T=25°C e UR=75%.

Tempo (h)	Perda de peso (%) ¹			
	FP	FEM	FTG	Sem Filme
0	0,0000 ^r	0,0000 ^r	0,0000 ^r	0,0000 ^r
4	0,0247±0,0080 ^{pqr}	0,0174±0,0016 ^{qr}	0,0210±0,0010 ^{pqr}	0,3500±0,0147 ⁿ
8	0,1235±0,0010 ^o	0,0905±0,0025 ^{opq}	0,1081±0,0013 ^{op}	0,5412±0,0150 ^l
24	0,4482±0,0011 ^m	0,3474±0,0235 ^r	0,3827±0,0370 ^{mn}	1,0286±0,0291 ⁱ
30	0,5597±0,0672 ^l	0,5915±0,0035 ^{kl}	0,5417±0,0218 ^l	1,1754±0,0973 ^{gh}
32	0,7268±0,0101 ^j	0,6450±0,0538 ^{jk}	0,6435±0,0074 ^k	1,2709±0,0125 ^f
48	1,1757±0,0604 ^{gh}	1,0199±0,0207 ⁱ	1,0982±0,0750 ^{hi}	1,7433±0,0182 ^d
52	1,2720±0,0161 ^f	1,1219±0,0211 ^h	1,2807±0,0044 ^f	1,8401±0,0005 ^c
56	1,4137±0,0803 ^e	1,2515±0,0286 ^{fg}	1,4634±0,0725 ^e	1,9688±0,0006 ^b
72	1,6941±0,0144 ^d	1,6692±0,0254 ^d	1,6652±0,0645 ^d	2,4342±0,0840 ^a

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, l, m, n, o, p, q, r – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

A hidrofiliçidade dos filmes protéicos favoreceu a transferência de vapor d'água, promovendo a perda de massa (umidade) em amostras de maçã (Baldwin et al., 1996). A adição do plastificante glicerol também produz efeito na perda de umidade, devido à sua natureza hidrofílica, que permite a ligação com moléculas de água. Filmes e coberturas protéicas podem atuar como barreira semipermeável à umidade, gases e compostos aromáticos, sendo utilizados como um complemento à embalagem sintética, além de apresentar um potencial econômico, pois sua matéria-prima é de baixo custo e biodegradável (Maté & Krochta, 1998).

Esta tendência da perda de peso gradual e contínua foi observada em pimentões recobertos com película de fécula de mandioca na ordem de 1,03%, e sem cobertura, 1,15% após 12 dias de armazenamento (Vicentini et al., 1999). Em cebolas frescas, a perda de peso foi de aproximadamente 2,80% após estocagem a 23°C e 70% de umidade relativa por 15 dias, e com cobertura de alginato foi de 1,80% (Hershko & Nussinovitch, 1998).

O teor de umidade final das maçãs após o tempo de armazenamento confirmou os resultados das curvas de perda de peso, como pode ser observado na Figura 45 e Tabela 46. Amostras de maçã em sistema aberto apresentaram menor teor de umidade após o acondicionamento, quando comparadas às acondicionadas em sistemas tampados com filmes protéticos.

Tabela 46: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de acondicionamento a 25°C e 75% de umidade relativa.

Tempo (h)	X (%) ¹			
	FP	FEM	FTG	Sem Filme
0	86,98±0,48 ^a	86,98±0,48 ^a	86,98±0,48 ^a	86,98±0,48 ^a
4	86,39±0,18 ^{abc}	86,64±0,51 ^{abc}	86,61±0,37 ^{ab}	85,51±0,38 ^{bcde}
8	86,32±0,07 ^{abcd}	86,41±0,37 ^{abc}	86,25±0,03 ^{abcd}	85,09±0,09 ^{def}
24	85,75±0,56 ^{abcd}	85,97±0,36 ^{abcd}	85,95±0,09 ^{abcd}	84,44±0,29 ^{ef}
48	85,62±0,06 ^{bcde}	85,49±0,20 ^{bcde}	85,26±0,45 ^{cdef}	84,08±0,14 ^f

a, b, c, d, e, f – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).
 1 - média±desvio padrão

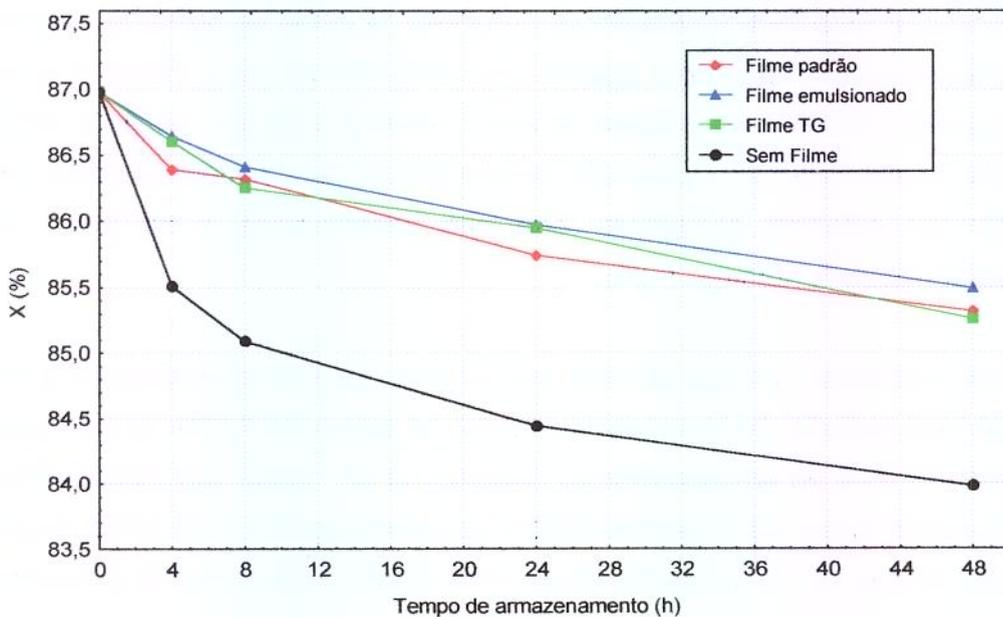


Figura 45: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de armazenamento em condições de temperatura e umidade relativa controladas (25°C e 75%).

A diferença no teor de umidade das maçãs acondicionadas em sistema fechado em função do tempo foi significativa somente após 48h de armazenamento, apresentando um valor médio de 85,46%. Este teor de umidade foi atingido em sistema aberto após 8h, indicando que a aplicação dos filmes retardou a perda no teor de umidade. O teor de umidade inicial das maçãs é muito alto, e qualquer perda de água provoca alterações que as tornam inaceitáveis para o consumo, sendo a textura uma das propriedades alteradas. Os resultados deste parâmetro, representados pela força necessária para perfurar as amostras de maçã, podem ser avaliados na Tabela 47 e Figura 46, observando a perda de textura em função do tempo de armazenamento após o corte.

Tabela 47: Perfil de textura das maçãs acondicionadas em sistemas de embalagem abertos e fechados com filmes protéicos de soro de leite a T=25°C e UR=75%.

Tempo (h)	F (N) ¹			
	FP	FEM	FTG	Sem Filme
0	2,0742±0,0136 ^a	2,0742±0,0136 ^a	2,0742±0,0136 ^a	2,0742±0,0136 ^a
4	1,8506±0,0046 ^{bc}	1,9187±0,1241 ^{ab}	1,9089±0,0267 ^{ab}	1,8172±0,0325 ^{bcd}
8	1,6227±0,0569 ^{def}	1,6967±0,1504 ^{cde}	1,7042±0,0496 ^{cde}	1,4765±0,0195 ^{fgh}
24	1,5341±0,0633 ^{efgh}	1,6477±0,0022 ^{cdef}	1,5757±0,1180 ^{efg}	1,4111±0,0549 ^{gh}
48	1,3539±0,0991 ^{hi}	1,5225±0,0306 ^{efgh}	1,4601±0,0137 ^{fgh}	1,1544±0,0231 ⁱ

a, b, c, d, e, f, g, h, i – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

Os filmes emulsionados (FEM) e modificados com a transglutaminase (FTG) mantiveram a textura das maçãs próxima à condição inicial por um período de tempo maior que o filme padrão, confirmando os resultados de permeabilidade ao vapor, sendo 0,2680gmm/hm²kPa, para filmes emulsionados, seguidos de 0,2705gmm/hm²kPa, para modificado com transglutaminase, e 0,3028gmm/hm²kPa, para filmes padrão. Em sistema aberto (sem filme), a força requerida para perfurar o pedaço de maçã foi menor do que em sistemas fechados. O valor atingido em 48 horas de armazenamento em sistema fechado foi equivalente a 8 horas em sistema aberto, indicando um prolongamento no tempo de armazenamento equivalente a 40 horas, quanto à barreira a oxigênio. Isto relata o aspecto visual final das amostras acondicionadas em sistema aberto, que já se apresentavam em processo de deterioração, com redução do tamanho (encolhimento no diâmetro e altura).

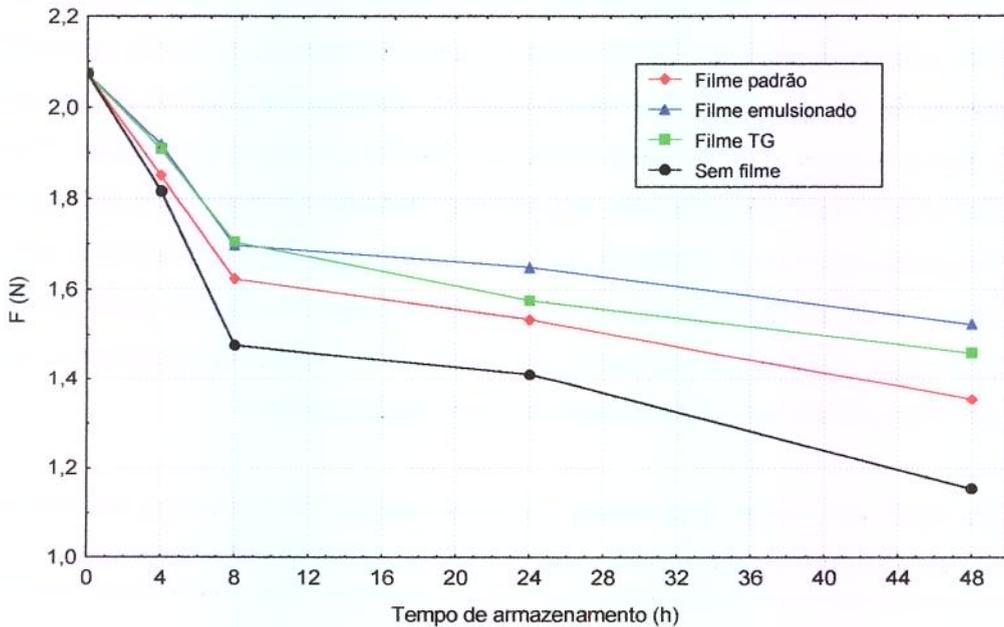


Figura 46: Perfil de textura das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite em função do tempo de armazenamento.

A mudança de cor nas amostras de maçã está diretamente relacionada com a enzima polifenoxidase, que age somente na presença de oxigênio, oxidando compostos fenólicos. Filmes poliméricos apresentam barreira a gases, devido à estrutura da rede filmogênica ser fechada e ordenada por pontes de hidrogênio (Yang & Paulson, 2000b). Esta propriedade foi avaliada através da determinação dos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) nos pedaços de maçã em função do tempo de armazenamento nas condições de 25°C e 75% de umidade relativa, em sistema aberto (sem filme) e sistema fechado com diferentes tipos de filmes, com e sem a injeção de gás nitrogênio. A Tabela 48 e Figura 47 apresentam a mudança do parâmetro L^* (índice de luminosidade) das maçãs, acondicionadas em sistema aberto e fechado sem a injeção de nitrogênio (representado pela denominação: ar) e com a injeção (N_2).

O índice de luminosidade das amostras de maçã diminuiu nas primeiras 4 horas de armazenamento, mantendo-se constante durante o armazenamento, ou seja, as maçãs tenderam a escurecer em sistemas aberto e fechado, com e sem a injeção de nitrogênio. As pequenas variações encontradas nos resultados iniciais ($t=0h$) podem estar associadas a diferentes estágios de maturação, possíveis defeitos causados por “batidas”,

fissuras, que aceleram o processo detereorativo, mas não impediram a análise da tendência dos parâmetros de cor em função do tempo de armazenamento.

Tabela 48: Índice de luminosidade (valores médio de $L^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com diferentes filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção do gás nitrogênio, na $T=25^\circ\text{C}$ e $UR=75\%$.

Sistema de embalagem		L^*				
		Tempo (h)				
		0	4	8	24	48
FP	ar	77,90±0,50 ^{ab}	69,04±0,5 ^{hij}	69,16±0,43 ^{hij}	69,64±0,89 ^g	68,76±0,69 ^{jk}
	N ₂	77,90±0,50 ^{ab}	67,84±0,75 ^{lmn}	70,31±1,8 ^f	70,80±1,23 ^e	68,92±1,22 ^{ijk}
FEM	ar	77,20±0,39 ^c	67,69±1,37 ^{lmno}	69,27±1,2 ^{ghi}	68,93±0,52 ^{ijk}	67,43±0,15 ^{nop}
	N ₂	77,20±0,39 ^c	69,42±1,13 ^{gh}	68,94±2,39 ^{ijk}	68,58±3,09 ^k	67,31±0,15 ^{op}
FTG	ar	77,52±1,16 ^{bc}	69,42±1,13 ^{lmn}	68,06±1,53 ^l	67,89±1,9 ^{lm}	68,51±1,91 ^k
	N ₂	77,52±1,16 ^{bc}	70,35±1,82 ^f	67,56±0,55 ^{mno}	67,23±0,44 ^p	67,89±3,20 ^{lm}
Sem Filme		77,99±1,34 ^a	71,34±1,10 ^d	68,82±0,23 ^{jk}	68,00±1,40 ^l	67,54±1,34 ^{mno}

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p – diferenças significativas entre as médias ($p<0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

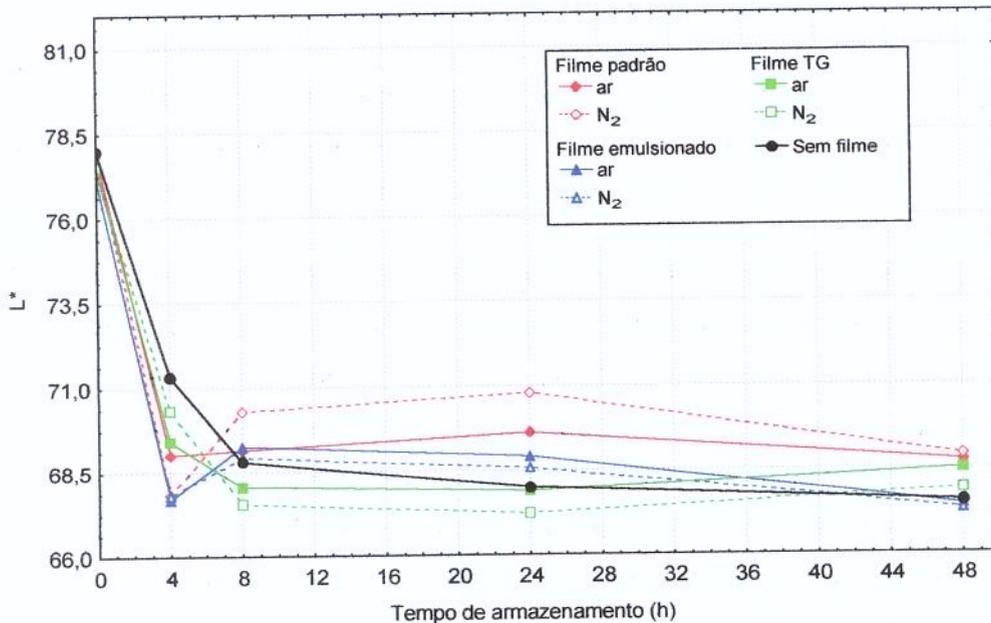


Figura 47: Índice de luminosidade das amostras de maçã armazenadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite.

O índice de croma a^* representa a mudança da cor de verde (valores negativos) para o vermelho (valores positivos), sendo que este parâmetro está relacionado com o escurecimento enzimático que ocorrem em maçãs. Segundo Baldwin et al. (1996), quanto maior a^* , maior foi o escurecimento das amostras. O escurecimento evidencia a ação da polifenoxidase, que resulta na redução da qualidade visual, em mudanças no aroma e perda de nutrientes (McHugh & Senesi, 2000). A Tabela 49 e Figura 48 apresentam os dados de a^* em função do tempo de armazenamento.

Tabela 49: Índice de croma (valor médio de $a^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite com (N_2) e sem (ar) a injeção do gás nitrogênio, na $T=25^\circ C$ e $UR=75\%$.

Sistema de embalagem		a^*				
		Tempo (h)				
		0	4	8	24	48
FP	ar	1,06 \pm 0,17 ^q	8,02 \pm 0,45 ^{ghij}	8,75 \pm 0,19 ^{bcd}	8,20 \pm 0,12 ^{efghij}	8,54 \pm 0,28 ^{bcdefg}
	N_2	1,06 \pm 0,17 ^q	7,87 \pm 0,07 ^{ijkl}	7,86 \pm 0,16 ^{ijkl}	7,28 \pm 0,23 ^{mn}	8,59 \pm 0,45 ^{bcdef}
FEM	ar	0,95 \pm 0,19 ^q	6,93 \pm 0,06 ⁿ	8,61 \pm 0,27 ^{bcdef}	8,80 \pm 0,14 ^{bc}	8,83 \pm 0,90 ^b
	N_2	0,95 \pm 0,17 ^q	5,40 \pm 0,21 ^p	7,89 \pm 0,11 ^{ijkl}	7,47 \pm 0,01 ^{klm}	8,45 \pm 0,38 ^{bcdef}
FTG	ar	1,18 \pm 0,50 ^q	7,18 \pm 0,04 ^{mn}	8,16 \pm 0,18 ^{fghij}	8,27 \pm 0,87 ^{cdefgh}	8,23 \pm 0,14 ^{defghi}
	N_2	1,18 \pm 0,50 ^q	6,34 \pm 0,04 ^o	7,95 \pm 0,30 ^{hijk}	7,37 \pm 0,40 ^{lmn}	8,53 \pm 0,44 ^{bcdefg}
Sem Filme		1,72 \pm 0,10 ^q	7,68 \pm 0,27 ^{klm}	8,70 \pm 0,38 ^{bcde}	9,51 \pm 0,72 ^a	9,63 \pm 0,51 ^a

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, l, m, n, o, p, q – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

O aumento no valor de a^* indicou a ocorrência do escurecimento enzimático nos pedaços de maçã durante a estocagem, com comportamento similar em sistema aberto e fechado, tendendo à coloração vermelha, observando uma diferença estatisticamente significativa nas amostras acondicionadas com a injeção de N_2 que apresentaram valores menores de a^* em relação aos potes fechados com ar ambiente. Em todas as condições trabalhadas, o valor do parâmetro a^* aumentou até 8 horas de armazenamento, podendo associar a uma concentração inicial de oxigênio dentro dos potes, suficiente para promover o escurecimento, devendo ressaltar que, durante o corte, já estava ocorrendo a ação da enzima.

Em sistema aberto, após 24 horas de armazenamento, o índice de croma a^* apresentou valores maiores. Neste caso as maçãs estavam em contato direto com o ar ambiente, ou seja, maior concentração de oxigênio, que promoveu maior escurecimento quando comparados com as amostras em sistemas fechados, e a injeção de nitrogênio diminuiu o valor do parâmetro a^* . Pode-se concluir que as embalagens protéicas atuaram com uma barreira a oxigênio moderada, e a atmosfera modificada é uma alternativa para retardar o escurecimento enzimático em maçãs. Maté & Krochta (1996b) concluíram que coberturas de isolado protéico de soro de leite diminuíram a concentração de oxigênio em amendoins, retardando o processo de rancidez. A composição atmosférica da embalagem foi o fator que mais influenciou a atividade da polifenoxidase em maçãs cortadas armazenadas em sacos plásticos (Soliva-Fortuny et al., 2001).

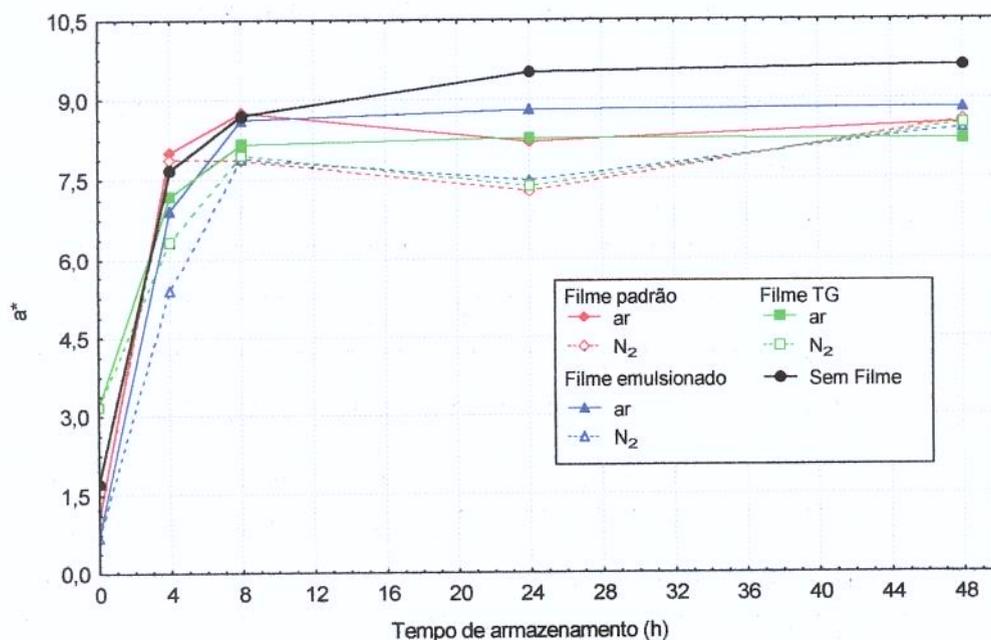


Figura 48: Índice de croma a^* das amostras de maçã acondicionadas a 25°C e 75% de umidade relativa em sistemas aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio.

O valor de a^* encontrado em 48h nas maçãs acondicionadas em sistema fechado foi atingido em 8h em sistema aberto, indicando que o filme promoveu a formação de barreira a oxigênio. A aplicação de atmosfera modificada (N_2) retardou o escurecimento em relação a sistemas somente fechados. Filmes emulsionados e modificados com a

transglutaminase apresentaram diferenças na barreira a oxigênio em um tempo equivalente à 24h de armazenamento, quando comparados com o filme padrão e o sistema aberto, ou seja, a presença do ácido graxo nesta concentração (0,50%) na formulação filmogênica não favoreceu a permeabilidade ao oxigênio, que é uma característica de filmes hidrofóbicos, a baixa barreira a gases. McHugh & Senesi (2000) também não constataram efeito significativo na adição de lipídio em coberturas a base de purê de maçã em pedaços de maçã, apesar de apresentarem valores menores de permeabilidade ao vapor d'água em relação ao filme controle.

O índice de croma b^* , representa a variação da cor azul ($-b^*$) para o amarelo ($+b^*$), avaliado na Tabela 50 e Figura 49, que apresentam os resultados em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio em função do tempo de armazenamento a 25°C e 75% de umidade relativa.

Tabela 50: Índice de croma (valor médio de $b^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com diferentes filmes protéicos de soro de leite com (N_2) e sem (ar) a injeção do gás nitrogênio, na $T=25^\circ C$ e $UR=75\%$.

Sistema de embalagem		b^*				
		Tempo (h)				
		0	4	8	24	48
FP	ar	32,04±0,20 ^l	43,24±1,50 ^{ef}	44,11±1,97 ^{cde}	44,59±0,66 ^{bcd}	41,47±0,65 ^{ij}
	N_2	32,04±0,20 ^l	44,86±2,04 ^{bcd}	45,31±0,81 ^{ab}	46,22±0,21 ^a	40,60±0,64 ^{jk}
FEM	ar	32,52±2,77 ^l	43,40±1,60 ^{ef}	42,93±1,36 ^f	41,58±0,70 ^{jh}	39,79±1,12 ^k
	N_2	32,52±2,77 ^l	45,03±0,74 ^{bc}	43,15±2,32 ^{ef}	41,75±0,26 ^{ghi}	40,22±1,66 ^k
FTG	ar	31,14±2,00 ^m	43,95±1,59 ^{de}	41,76±1,25 ^{ghi}	40,78±3,45 ^{ijk}	41,47±1,53 ^{ij}
	N_2	31,14±2,00 ^m	41,49±0,80 ^{ij}	42,68±0,88 ^{fg}	40,22±1,17 ^k	40,73±0,78 ^{jk}
Sem Filme		31,92±0,17 ^m	42,53±0,38 ^{gh}	44,43±1,57 ^{bcd}	46,15±0,72 ^a	41,46±0,27 ^{ij}

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, l, m – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

As maçãs tenderam a uma coloração amarela mais forte (maior b^*) em todas as condições trabalhadas, mas este índice não apresentou relação representativa da mudança de cor entre os diferentes sistemas de embalagem em função do tempo de armazenamento, nem com as embalagens com atmosfera modificada.

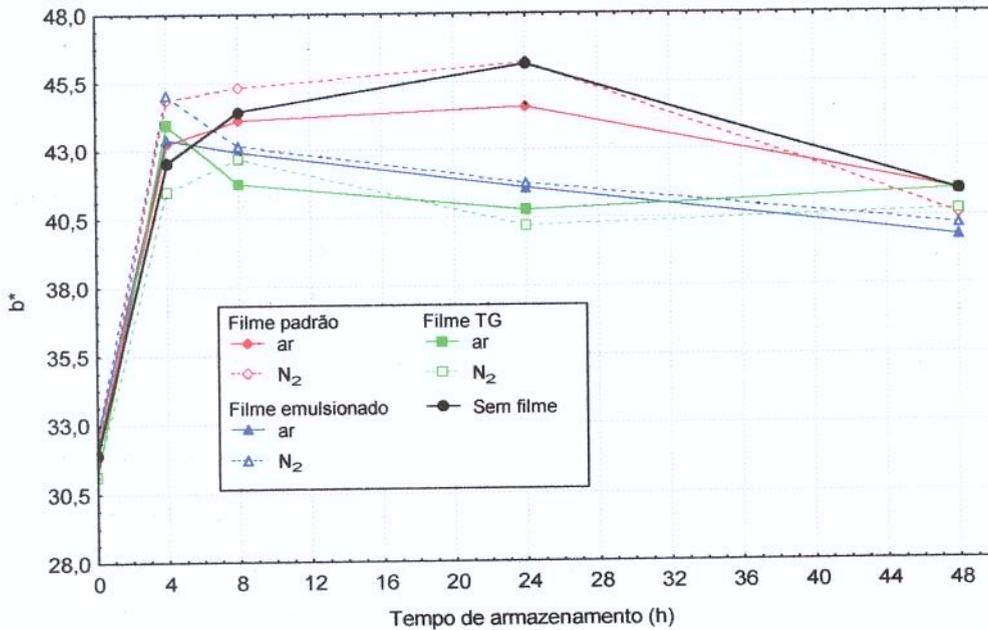


Figura 49: Índice de cor b^* das amostras de maçã acondicionadas a 25°C e 75% de umidade relativa em sistemas aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio.

Baldwin et al. (1996) avaliaram a mudança de cor em pedaços de maçã acondicionadas em sacos plásticos a temperatura ambiente, observando o aumento nos índices de cor a^* e b^* e a diminuição na luminosidade L^* , sendo que representaram a porcentagem de inibição do escurecimento através da variação no parâmetro a^* .

8.2.2 - Armazenamento a frio

O consumo de alimentos minimamente processados vem aumentando, devido ao crescimento da procura de produtos mais saudáveis, naturais e com maior praticidade. Manter a qualidade destes produtos é um fator importante e crítico, pois o tempo de armazenamento é curto. Alternativas têm sido expostas, sendo que filmes protéicos podem ser considerados uma delas, como um complemento à embalagem sintética.

Alimentos minimamente processados são armazenados geralmente em temperaturas mais baixas, que previnem o desenvolvimento microbiano e reduzem a taxa de respiração celular, retardando o apodrecimento. As amostras de maçã foram armazenadas na temperatura de 10°C, simulando a condição da geladeira, aproximando-se da situação real cotidiana. A umidade relativa de uma geladeira não é controlada e depende do tipo de produto armazenado, que troca umidade com o ar ambiente até o equilíbrio. Desta forma, esta variável foi medida durante o tempo de acondicionamento, somente para controle do processo, apresentando um valor médio de 73%.

A perda de peso das amostras de maçã em função do tempo de acondicionamento em sistema aberto (sem filme) e sistema fechado com filme padrão (FP), filme emulsionado (FEM) e modificado enzimaticamente com transglutaminase (FTG) pode ser analisada na Tabela 51 e Figura 50. Novamente, o comportamento das maçãs armazenadas em sistema fechado com e sem a injeção de nitrogênio foi similar, sendo então apresentado a média dos resultados obtidos para cada tipo de filme.

Tabela 51: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas em sistemas de embalagem aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite a 10°C.

Tempo (h)	Perda de peso (%) ¹			
	FP	FEM	FTG	Sem Filme
0	0,0000 ^u	0,0000 ^u	0,0000 ^u	0,0000 ^u
4	0,4113±0,0011 ^{tu}	0,4076±0,0028 ^{tu}	0,4808±0,0359 ^t	2,5185±0,1683 ^p
8	0,7027±0,0078 ^t	0,6908±0,0406 ^t	0,7413±0,0390 ^t	4,0900±0,0235 ^m
24	1,8157±0,0868 ^{sr}	1,7659±0,0044 ^s	1,9091±0,0356 ^{sr}	11,2970±0,3667 ^h
30	2,0942±0,0503 ^{pqrs}	2,0037±0,0161 ^{qrs}	2,1938±0,0463 ^{pqrs}	12,5467±0,0433 ^g
32	2,3915±0,0853 ^{pq}	2,2471±0,0065 ^{pqr}	2,4676±0,0488 ^p	13,8681±0,0550 ^f
48	3,3300±0,0566 ^o	3,2354±0,0259 ^o	3,6000±0,1283 ^{no}	17,6874±0,0894 ^e
56	3,8914±0,0337 ^{mn}	3,6524±0,0482 ^{mno}	4,0682±0,1219 ^m	20,4267±0,2257 ^d
72	5,0042±0,1594 ^l	4,6239±0,0488 ^l	5,0627±0,0230 ^l	25,0819±0,1485 ^c
96	6,5322±0,1556 ^j	6,0714±0,0701 ^k	6,6858±0,0469 ^j	31,8834±0,7361 ^b
120	—	7,6289±0,0132 ⁱ	8,0681±0,0629 ⁱ	36,3361±0,3729 ^a

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

A perda de peso aumentou gradualmente em função do tempo, sendo mais acentuada em maçãs acondicionadas em sistema aberto e, em sistema fechado não foi observada diferença significativa entre os diferentes tipos de filme para cada tempo. A perda de peso atingida em 96 horas em sistema aberto foi de 31,88% e em sistema fechado, de 6,53% com filme padrão, de 6,07% com filme emulsionado e de 6,69% com filme modificado enzimaticamente. Em sistema aberto, a perda de peso equivalente à condição final em sistema fechado (t=96h) foi atingida em aproximadamente 13h de acondicionamento, indicando um prolongamento no tempo de armazenamento, em termos de migração de umidade sob refrigeração, como consequência da propriedade de barreira a vapor d'água dos filmes protéicos de soro de leite.

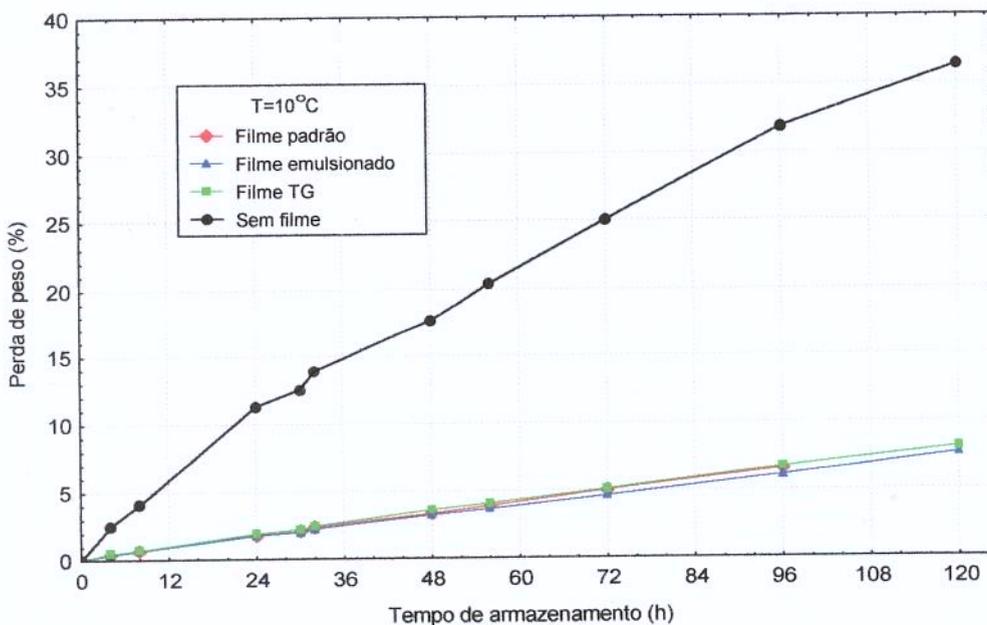


Figura 50: Perda de peso das amostras de maçã acondicionadas a 10°C em sistema aberto e fechado com diferentes tipos de filmes protéicos de soro de leite

O teor de umidade das maçãs após o acondicionamento confirmou os resultados de perda de peso, onde as acondicionadas em sistema aberto apresentaram maior redução no teor de umidade, e em sistema fechado com os diferentes tipos de filmes, não apresentaram diferença significativa entre si, somente podendo ressaltar que filmes emulsionados apresentaram o maior teor de umidade em relação a todas as condições trabalhadas (Tabela 52 e Figura 51).

Tabela 52: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de acondicionamento na temperatura de 10°C.

Tempo (h)	X (%) ¹			
	FP	FEM	FTG	Sem Filme
0	86,97±0,30 ^a	86,97±0,30 ^a	86,97±0,30 ^a	86,97±0,30 ^a
4	85,17±0,17 ^a	85,99±0,11 ^a	85,21±0,13 ^a	84,52±0,39 ^{ab}
8	84,65±0,29 ^{ab}	86,20±0,37 ^a	84,51±0,10 ^{ab}	83,51±1,32 ^{ab}
24	83,56±0,90 ^{ab}	84,20±0,20 ^{ab}	83,83±0,99 ^{ab}	82,30±0,63 ^{ab}
48	82,76±0,15 ^{ab}	83,85±0,70 ^{ab}	83,02±1,34 ^{ab}	80,02±0,63 ^{abc}
96	81,25±0,20 ^{abc}	82,96±0,77 ^{ab}	81,98±1,16 ^{ab}	75,01±1,10 ^c

a, b, c – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média±desvio padrão

A diferença no teor de umidade não foi significativa durante o armazenamento em sistema fechado, mas a mínima perda de água em pedaços de maçã fresca provoca alterações marcantes no aspecto físico e visual. No final do experimento, as amostras de maçã haviam encolhido (reduziram o diâmetro e espessura), enrugado e amolecido, principalmente as acondicionadas em sistema aberto.

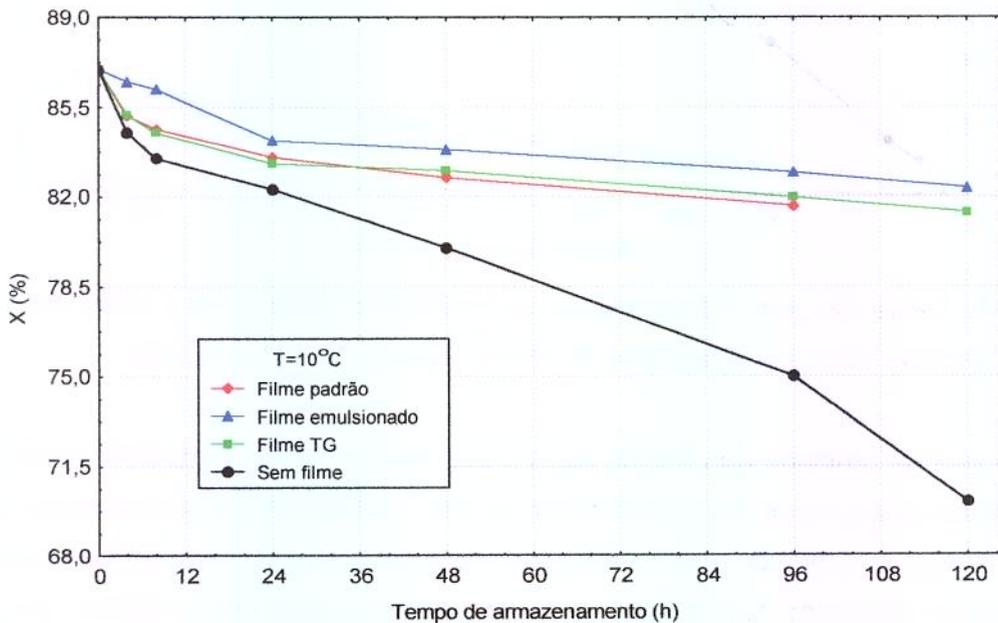


Figura 51: Teor de umidade das amostras de maçã em função do tempo de armazenamento em condições de temperatura de 10°C.

A perda de umidade em alimentos com alto teor de umidade, como a maçã, tende a perder a suculência e a frescura (Szczeniak, 1998). Em cenouras descascadas, Li & Barth (1998), constataram uma diminuição no teor de umidade na ordem de 1,00% após o armazenamento sob refrigeração, mas com mudanças visuais acentuadas.

A textura das maçãs seguiu a mesma tendência acima descrita para a perda de peso e teor de umidade, decresceu com o tempo de armazenamento, necessitando uma menor força de perfuração, ou seja, afastando-se da condição de fruta fresca. Os resultados da redução de textura, a 10°C em sistema aberto (sem filme) e sistema fechado com diferentes tipos de filme, podem ser analisados na Tabela 53.

Tabela 53: Perfil de textura das maçãs acondicionadas em sistemas de embalagem abertos e fechados com filmes protéicos de soro de leite a 10°C.

Tempo (h)	F (N) ¹			
	FP	FEM	FTG	Sem Filme
0	2,2483±0,0313 ^a	2,2483±0,0313 ^a	2,2483±0,0313 ^a	2,2483±0,0313 ^a
4	1,9508±0,0121 ^b	2,0307±0,0157 ^{ab}	1,9529±0,0045 ^b	1,9122±0,0518 ^{bc}
8	1,8846±0,0161 ^{bcd}	1,9752±0,0588 ^b	1,9430±0,0205 ^b	1,8325±0,1136 ^{bcd}
24	1,6816±0,0022 ^{def}	1,8789±0,0652 ^{bcd}	1,6968±0,0267 ^{cdef}	1,6401±0,0037 ^{ef}
48	1,5264±0,0035 ^{fg}	1,6615±0,0098 ^{def}	1,6185±0,0419 ^{ef}	1,3821±0,0046 ^{gh}
96	1,4862±0,0386 ^{fg}	1,6303±0,0187 ^{ef}	1,5390±0,1372 ^{fg}	1,2075±0,0207 ^h

a, b, c, d, e, f, g, h – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

1 - média ± desvio padrão

Até 4 horas de armazenamento, somente as amostras fechadas com os filmes emulsionados mantiveram a textura próxima à inicial, evidenciando uma menor permeabilidade ao vapor d'água de filmes contendo lipídio. Após este período, em todos os tratamentos, houve redução da força de perfuração, confirmando o aspecto visual de maçãs com menores tamanhos e secos. Em t=96 horas, as maçãs acondicionadas em sistema fechado apresentaram uma textura similar à atingida em 48 horas em sistema aberto, indicando que a aplicação de filmes protéicos aumentou o tempo de armazenamento a 10°C. A Figura 52 ilustra as curvas de textura em função do tempo, observando uma perda mais acentuada em sistema aberto (sem filme).

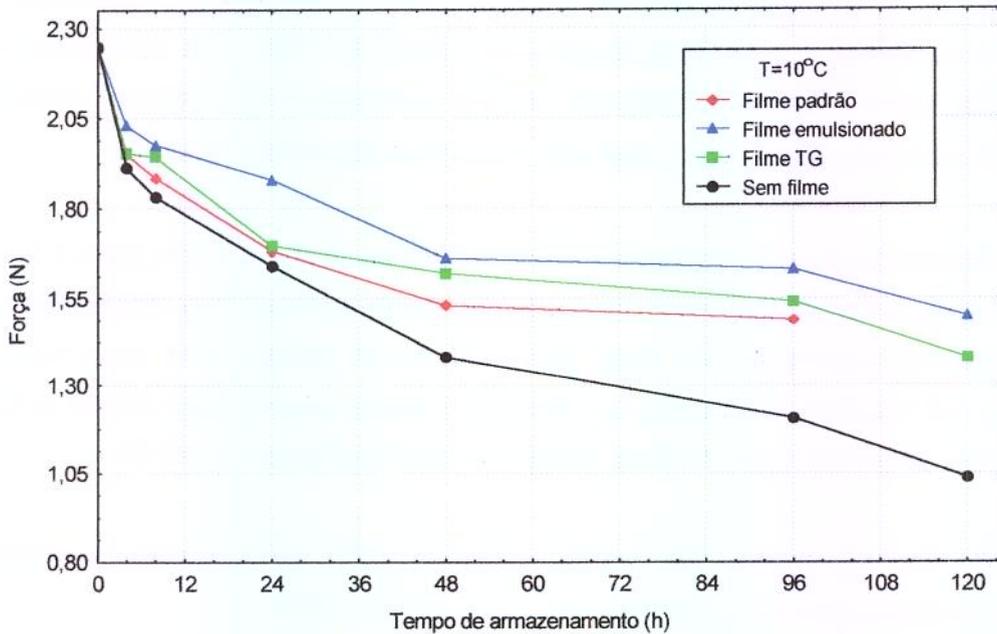


Figura 52: Perfil de textura das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto (sem filme) e fechado com filmes protéicos de soro de leite obtidos por diferentes processos (N) em função do tempo de armazenamento a 10°C.

A redução do tamanho dos pedaços de maçã foi visualmente perceptível, principalmente as acondicionadas em sistema aberto, confirmando os resultados obtidos quanto à perda de umidade. É importante ressaltar que neste estudo não houve a preocupação em definir condições ótimas de armazenamento do produto, ou seja, que mantivessem as características das maçãs aceitáveis para o consumo, e sim avaliar as propriedades dos filmes protéicos de soro de leite, determinando a atuação dos mesmos como barreira à umidade e gases, observando sua integridade durante todo o período de armazenamento (ausência de fraturas, fissuras). Desta forma, pode-se concluir que os filmes protéicos atuaram como uma barreira moderada à umidade em armazenamento a frio (10°C).

A avaliação da permeabilidade a gases dos filmes na temperatura de 10°C foi efetuada, baseando-se na variação de cor dos pedaços de maçã, medida através da luminosidade e índice de croma a^* e b^* . O índice de luminosidade (L^*) em função do tempo de armazenamento está apresentado na Tabela 54 e Figura 53.

Tabela 54: Índice de luminosidade (valor médio de $L^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos com (N_2) e sem (ar) a injeção de nitrogênio, na $T=10^\circ C$.

Sistema de embalagem		L^*					
		Tempo (h)					
		0	4	8	24	48	96
FP	ar	78,38±0,21 ^b	68,96±0,15 ^{lmn}	67,34±0,55 ^p	67,21±0,85 ^p	67,16±0,07 ^p	---
	N_2	78,38±0,21 ^b	68,12±1,33 ^o	69,33±0,65 ^{kl}	70,38±0,76 ^{fgh}	69,09±0,87 ^{lm}	---
FEM	ar	78,97±0,84 ^{ab}	69,31±1,80 ^{kl}	68,66±0,93 ^{mno}	69,86±1,60 ^{hijk}	72,38±2,71 ^c	68,06±1,04 ^o
	N_2	78,97±0,84 ^{ab}	68,64±0,66 ^{mno}	69,32±0,02 ^{ijkl}	69,31±1,01 ^{ijkl}	72,92±1,72 ^c	70,40±1,51 ^{efgh}
FTG	ar	79,29±1,22 ^a	70,63±1,44 ^{defg}	69,09±0,04 ^{ijkl}	69,20±0,01 ^{klm}	69,03±1,30 ^{lmn}	67,28±0,56 ^p
	N_2	79,29±1,22 ^a	70,04±2,02 ^{ghi}	70,76±2,02 ^{def}	69,79±2,24 ^{hijk}	69,41±0,27 ^{ijkl}	71,22±0,02 ^a
Sem Filme		79,14±1,15 ^a	68,39±0,17 ^{no}	70,99±0,26 ^{de}	69,79±0,67 ^{hijk}	66,44±1,47 ^q	62,71±2,94 ^f

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

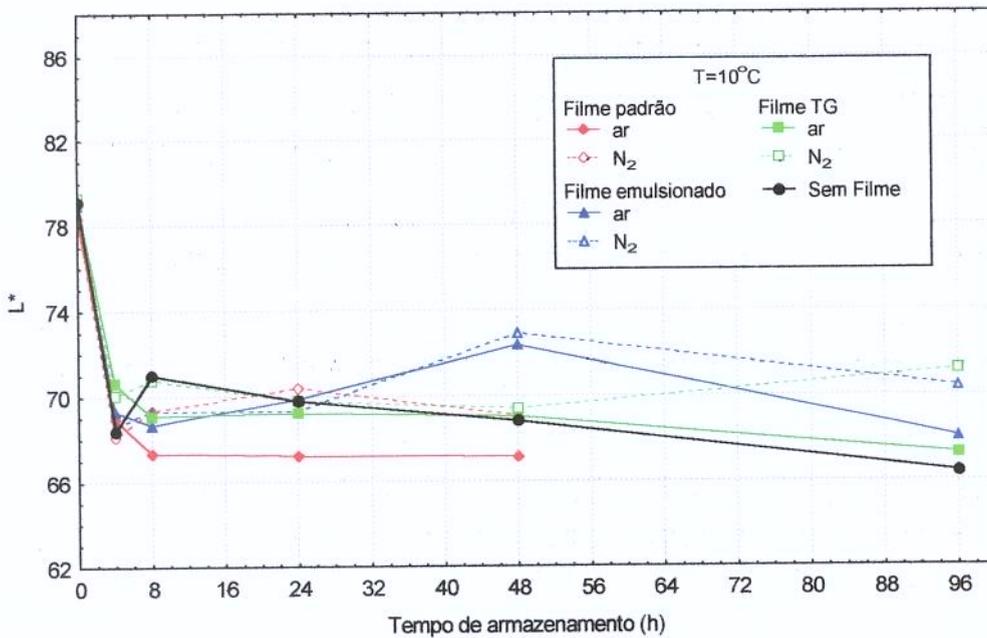


Figura 53: Índice de luminosidade das amostras de maçã armazenadas em sistema aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite a $10^\circ C$.

As maçãs após o corte tenderam a escurecer, reduzindo a luminosidade quando armazenadas em sistema aberto e fechado, diminuindo até 8 horas de armazenamento, mantendo-se constante após este período. A injeção de nitrogênio dentro das embalagens manteve uma maior luminosidade dos pedaços de maçã quando comparadas com as acondicionadas em embalagens fechadas sem injeção de nitrogênio. O mesmo resultado foi observado por Soliva-Fortuny et al. (2001) em maçãs armazenadas sob refrigeração em sacos plásticos em atmosfera modificada com nitrogênio, apresentando um decréscimo exponencial de L^* durante o armazenamento, de 83,20 a 79,80 após 90 dias.

A variação no parâmetro a^* , relacionado ao escurecimento enzimático das maçãs, está representada na Tabela 55, em função do tempo de armazenamento a 10°C.

Tabela 55: Índice de croma (valor médio de $a^* \pm$ desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes protéticos com (N_2) e sem (ar) a injeção do gás nitrogênio, na $T=10^\circ C$.

Sistema de embalagem		a^*					
		Tempo (h)					
		0	4	8	24	48	96
FP	ar	1,29±0,07 ⁿ	7,47±0,20 ^{ghij}	7,96±0,37 ^{efghi}	9,27±0,70 ^{bc}	9,30±0,05 ^b	---
	N_2	1,29±0,07 ⁿ	6,34±0,29 ^{lm}	7,31±0,97 ^{ijk}	7,02±0,82 ^{ikl}	7,79±0,50 ^{efghi}	---
FEM	ar	1,20±0,29 ^o	6,16±0,65 ^m	8,45±0,71 ^{de}	8,29±0,36 ^{def}	8,45±0,06 ^{de}	9,87±0,28 ^{ab}
	N_2	1,20±0,29 ⁿ	6,64±0,42 ^{klm}	7,71±0,11 ^{fg hij}	7,86±0,54 ^{ghij}	7,54±0,26 ^{fg hi}	8,49±0,39 ^{de}
FTG	ar	1,18±0,50 ⁿ	6,41±0,44 ^{lm}	8,39±0,18 ^{def}	8,05±0,87 ^{defgh}	8,18±0,14 ^{defg}	8,49±0,14 ^{de}
	N_2	1,18±0,50 ⁿ	6,17±0,14 ^m	7,72±0,65 ^{fg hij}	7,96±0,40 ^{defghi}	7,41±0,55 ^{hij}	7,96±0,15 ^{defghi}
Sem Filme		1,19±0,02 ⁿ	7,81±0,43 ^{efghi}	8,58±0,28 ^{cd}	9,39±0,66 ^b	10,53±0,51 ^a	10,15±0,30 ^a

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n – diferenças significativas entre as médias ($p < 0,05$) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

Em todas as condições trabalhadas, os valores de a^* aumentaram gradualmente com o tempo, indicando a ocorrência do escurecimento enzimático, sendo mais acentuado em sistema aberto, onde as amostras de maçã estão em contato direto com o ar ambiente (Figura 54). Baldwin et al. (1996) também não conseguiram evitar o

escurecimento com a aplicação de cobertura de carboximetilcelulose em fatias de maçã acondicionadas em sacos plásticos a 4°C, observando que o escurecimento foi retardado após a imersão em antioxidantes, acidulantes e conservantes.

A embalagem em atmosfera modificada promoveu um menor escurecimento em todo o período de armazenamento, quando comparada às embalagens sem injeção de nitrogênio, podendo considerar a redução da concentração inicial de oxigênio uma técnica favorável. Nicoli et al. (1994) concluíram que a embalagem plástica em atmosfera modificada (N₂/CO₂) reduziu a concentração de oxigênio e foi efetiva na prevenção da reação de escurecimento enzimático em fatias de maçã por no mínimo 9 dias de estocagem. Em pedaços de manga cobertos com filmes de polissacarídeo e cera de carnaúba, a permeância de oxigênio foi menor em relação à do controle (sem cobertura), mas com diferenças pequenas (Baldwin et al., 1999).

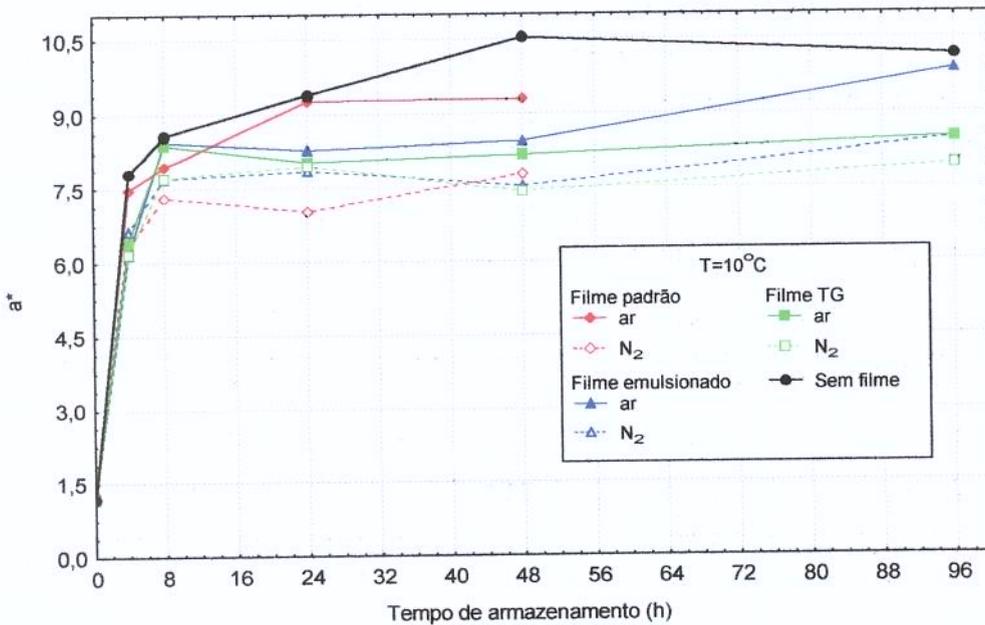


Figura 54: Índice de cor a^* das amostras de maçã acondicionadas a 10°C em sistemas aberto e fechado com filmes protéicos de soro de leite com e sem a injeção de nitrogênio.

O escurecimento enzimático das maçãs, representado pelo parâmetro a^* , encontrado após 24h de armazenamento a 10°C em sistema aberto, foi atingido neste mesmo período em sistema fechado com filme padrão, em 96h com filmes emulsionados. E, em filmes modificados com a enzima, este parâmetro aumentou até 8h, mantendo-se

constante até o final. Através destes resultados, concluiu-se que os filmes atuaram como barreira a oxigênio, prolongando o tempo de armazenamento das amostras de maçã acondicionadas a frio, evidenciando a estrutura da matriz filmogênica, apresentando exposição de grupos polares, que favorecem a barreira a substâncias não polares, tais como oxigênio e alguns compostos aromáticos. Deve-se ressaltar que a embalagem de frutas e vegetais frescos requer uma transferência mínima de O₂ e CO₂ para manter a respiração em taxas reduzidas.

A mudança do parâmetro b* das amostras de maçã em função do tempo de armazenamento está representada na Tabela 56 e Figura 55.

Tabela 56: Índice de croma (valor médio de b*±desvio padrão) das amostras de maçã acondicionadas em sistema aberto e fechado com filmes de soro de leite com (N₂) e sem a injeção de nitrogênio, na T=10°C.

Sistema de embalagem		b*					
		Tempo (h)					
		0	4	8	24	48	96
FP	ar	30,95±0,95 ^s	42,40±1,80 ^{ghi}	43,92±0,95 ^{abcd}	43,22±0,28 ^{defg}	42,21±1,29 ^{hij}	---
	N ₂	30,95±0,95 ^s	41,33±1,39 ^{klm}	43,48±0,82 ^{cde}	41,18±2,09 ^{klmn}	41,41±0,53 ^{ijklm}	---
FEM	ar	30,59±0,40 ^s	43,13±1,07 ^{defg}	42,98±0,04 ^{efgh}	44,78±1,87 ^a	43,13±0,74 ^{defg}	40,06±0,89 ^{opq}
	N ₂	30,59±0,40 ^s	42,62±0,41 ^{fghi}	41,23±0,05 ^{klm}	42,65±3,97 ^{efghi}	40,77±1,02 ^{lmno}	39,70±0,25 ^{pqr}
FTG	ar	29,97±0,85 ^s	41,84±0,20 ^{nop}	41,46±1,43 ^{lmno}	42,43±1,42 ^{ghi}	43,37±0,12 ^{def}	41,48±0,02 ^{kl}
	N ₂	29,97±0,85 ^s	40,37±0,05 ^{nop}	38,90±1,42 ⁿ	39,30±0,55 ^{gr}	40,61±0,02 ^{mno}	40,13±0,02 ^{opq}
Sem Filme		30,67±1,20 ^s	40,37±0,52 ^o	44,29±0,41 ^o	44,36±0,91 ^{ab}	43,90±0,99 ^{bcd}	41,03±1,65 ^{klmn}

a, b, c, d, e, f – diferenças significativas entre as médias (p<0,05) calculadas através do método de Tukey pelo programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

Os pedaços de maçã tenderam a uma coloração amarela mais forte nas primeiras 8 horas de acondicionamento, representada pelo índice de croma b*, mantendo-se constante até o final do armazenamento, em todos os tipos de embalagem aplicados. Mas, não apresentou relação com o tempo de armazenamento e tipo de tratamento (com ou sem a injeção de nitrogênio).

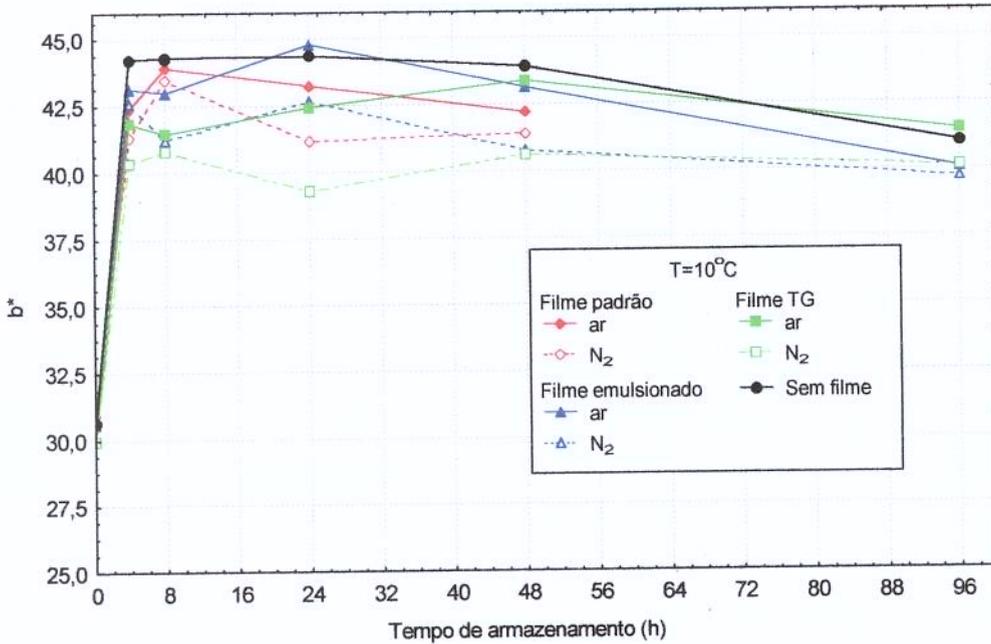


Figura 55: Índice de croma b^* das amostras de maçã acondicionadas a 10°C de em sistemas aberto (sem filme) e fechado com filmes protéticos de soro de leite.

A permeabilidade a gases dos filmes protéticos de soro de leite foi melhor representada através dos parâmetros de cor a^* e L^* , relacionado ao comportamento de escurecimento enzimático das amostras de maçã acondicionadas neste sistema de embalagem, nas diferentes condições de armazenamento. Confirmou-se a afirmação de Sapers & Douglas Jr (1987), onde o escurecimento enzimático em maçãs cortadas pode ser monitorado pela medida das mudanças nos índice de luminosidade L^* e a^* .

8.3 – Conclusões Parciais

Filmes protéticos de soro de leite apresentaram barreira à umidade e gases moderada quando comparados ao armazenamento em sistema aberto (sem tampa), nas condições de 25°C e 75% de umidade relativa e 10°C, mantendo a sua integridade até o final do armazenamento, indicando um grande potencial para a aplicação como embalagem, evidenciando as características de permeabilidade ao vapor d'água e gases, e as propriedades mecânicas.

Em relação à migração de umidade (perda de peso, teor de umidade e mudança de textura), a aplicação dos filmes protéicos de soro de leite acondicionados a 25°C e 75% de umidade relativa apresentou diferença equivalente a 40 horas no tempo de armazenamento, estando diretamente relacionada à permeabilidade ao vapor d'água dos filmes. Na mesma proporção quanto ao escurecimento enzimático em relação ao do sistema aberto. O armazenamento em temperatura mais baixa (10°C) apresentou diferença nos valores equivalente a 80 horas no tempo de armazenamento quanto à perda de peso, e o escurecimento apresentou melhores valores de a^* com filmes modificados com transglutaminase.

A diferença de peso, teor de umidade e mudança de textura das maçãs acondicionadas com diferentes tipos de filmes (padrão, emulsionado e modificado enzimaticamente) não foi estatisticamente significativa em função do tempo de armazenamento, apesar do valor de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes encontrado ter sido diferente. Ou seja, neste tipo de aplicação com alimento com alto teor de umidade, não foi possível detectar esta diferença.

O escurecimento enzimático das maçãs foi evidenciado pelo índice de croma a^* , que aumentou em função do tempo de armazenamento, apresentando diferença em relação ao das amostras acondicionadas em atmosfera modificada com gás N_2 .

A escolha da maçã, neste estudo, como o produto alimentício foi baseada na sua deterioração rápida, ou seja, devido ao seu alto teor de umidade e escurecimento, não havendo a preocupação com o aspecto final da maçã após o armazenamento, e sim com o comportamento das propriedades finais dos filmes, quanto à barreira à umidade e gases e propriedades mecânicas. A avaliação da vida de prateleira do alimento embalado com filmes protéicos de soro de leite é um tema interessante para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 9

9 – Conclusões Gerais

O planejamento fatorial permitiu determinar a melhor formulação de filmes protéicos a base de soro de leite, observando as características mecânicas e de barreira favoráveis e avaliando a importância (efeito) das variáveis, concentração de proteína (Cp), concentração de plastificante (Cg) e pH, onde as faixas de valores estudadas foram , de 4,82 a 8,18%, de 1,82 a 5,18% e 5,20 a 8,60, respectivamente:

- A menor solubilidade protéica do filme foi obtida para maior Cp (7,50%), ao contrário da permeabilidade ao vapor d'água que foi menor em 5,50%. Quanto às propriedades mecânicas, a tensão na ruptura foi maior nas faixas entre 5,50-8,18% e a maior porcentagem de alongação encontrada foi na faixa entre 5,50-7,50% de proteína. É interessante trabalhar com características boas de barreira e mecânicas, sendo que uma concentração intermediária de proteína torna-se mais adequada (6,00-6,50%).
- A adição de glicerol favoreceu as propriedades mecânicas, mas diminuiu as propriedades de barreira de filmes protéicos. A menor quantidade de plastificante adicionada (2,50%) resultou em um menor valor de solubilidade protéica e permeabilidade ao vapor d'água. Quanto à tensão na ruptura, foi maior para 1,82% de plastificante, mas, reduziu a eficácia quanto à capacidade de estender (alongação) do filme, sendo esta maior em Cg igual a 4,50%. Portanto, para

manter a integridade mecânica, satisfazendo as condições de barreira dos filmes, a faixa de concentração de plastificante ideal para trabalhar foi de 3,00-3,50%.

- O pH básico (7,90) promoveu as melhores características mecânicas e de barreira, apenas ressaltando a tensão na ruptura que encontrou uma melhor região na faixa entre 5,90 e 7,90. O uso de filmes como embalagens em alimentos deve considerar que o desenvolvimento microbiano é favorecido em pH básico.

A melhor formulação determinada para filmes protéicos de soro de leite, visando manter boas características de barreira e mecânicas foi: concentração de proteína 6,50%; concentração de plastificante 3,00% e pH 7,00. Deve-se ressaltar que todos os resultados para a permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação corresponderam às condições de 75% de umidade relativa e 25°C.

A equação de GAB foi o modelo que melhor representou os dados de adsorção dos filmes protéicos de soro de leite, apresentando uma forma sigmoideal. A influência da temperatura foi verificada entre as curvas de adsorção dos filmes protéicos. Em temperatura mais alta, a adsorção de vapor d'água pelos filmes é menor, em um valor fixo de atividade de água. O calor de sorção dos filmes protéicos diminuiu com o aumento do teor de umidade.

A adição de ácido esteárico na formulação de filmes protéicos de soro de leite provocou uma redução na solubilidade protéica, permeabilidade ao vapor d'água, tensão na ruptura e porcentagem de alongação. Ou seja, melhorou as propriedades de barreira, mas reduziu as mecânicas, tornando os filmes mais fáceis de quebrar e menos elásticos. Estas tendências se acentuavam com o aumento da concentração de lipídio.

Não foi possível caracterizar filmes emulsionados de proteínas de soro de leite em pH ácido, devido ao aumento da viscosidade da solução filmogênica, promovendo a incorporação de bolhas e a formação de filmes com poros, fissuras e manuseio difícil. Ou seja, valores baixos de pH, próximos ao ponto isoelétrico, aumentaram a força de atração entre as cadeias de proteínas, formando agregados (precipitados) e aumentando a viscosidade da solução.

Em pH básico (pH 9,0), os filmes emulsionados apresentaram uma menor solubilidade protéica e permeabilidade ao vapor d'água em relação à dos filmes em pH neutro (pH 7,0), e quanto às propriedades mecânicas, a tensão na ruptura foi menor e a porcentagem de alongação maior. Assim, concluiu-se que uma melhor formação da matriz filmogênica ocorreu em pH alcalino, associado à maior reatividade do grupo SH, promovendo a formação de ligações covalentes dissulfídicas entre as cadeias protéicas. Em pH 7,0, os filmes emulsionados apresentaram resultados significativos estatisticamente, e deve-se ressaltar que, dependendo da aplicação dos filmes, é mais interessante trabalhar com uma formulação em pH neutro do que em básico, no que diz respeito à propensão de desenvolvimento microbiano.

Um modelo linear descreveu a difusão de vapor d'água através dos filmes protéicos de soro de leite, acondicionados em diferentes posições, vertical e horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo. O coeficiente de difusão obtido a partir do ajuste do modelo aos resultados de adsorção dos filmes protéicos acondicionados na posição vertical foi de $D_V = 9,3 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e a densidade de água adsorvida foi $C_S - C_O = 2,05 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

A partir dos dados experimentais concluiu-se que a força da gravidade não apresentou nenhum efeito no processo de adsorção na posição horizontal, e o cálculo do coeficiente de difusão e da concentração de umidade na superfície foi feito a partir de um modelo linear de difusão. Os coeficientes de difusão dos filmes na posição horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo não apresentaram diferença significativa, sendo então calculado a partir da média das massas de vapor d'água adsorvida nas duas posições. O valor encontrado foi $D_H = 5,10 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e a concentração de umidade adsorvida no equilíbrio, $C_S - C_O = 2,79 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

A adição de um composto hidrofóbico (ácido esteárico) na formulação de filmes protéicos de soro de leite reduziu o coeficiente de difusão dos filmes acondicionados na posição vertical, $D_{emV} = 2,5 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e a concentração de umidade, $(C_S - C_O)_{emV} = 2,10 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. A diferença encontrada em filmes emulsionados acondicionados na posição horizontal com a face do filme voltada para cima e para baixo não foi significativa, indicando que a força da gravidade não provocou efeito no processo difusivo do vapor

d'água, o coeficiente de difusão encontrado foi $D_{emH} = 5,1 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e a concentração de umidade, $(C_S - C_O)_{emH} = 2,87 \times 10^2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$

A modificação enzimática pela transglutaminase promoveu ligações covalentes isopeptídicas entre as cadeias das proteínas do soro de leite, formando uma matriz polimérica com melhores propriedades de barreira e mecânicas. A melhor concentração de transglutaminase foi de 10U/g proteína em filmes contendo 6,5% de proteína, 3,0% plastificante (glicerol) e pH 7,0. O aumento na concentração de enzima reduziu os valores de permeabilidade d'água dos filmes, aumentou a tensão na ruptura e porcentagem de alongação, mas provocou o aumento da solubilidade protéica. O tempo de reação que promoveu a formação de filmes com melhores propriedades de barreira e mecânica foi de 180 minutos. Quanto maior o tempo de reação, na presença de transglutaminase, menor a permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade protéica, maiores tensão na ruptura e porcentagem de alongação dos filmes protéicos de soro de leite.

O uso do produto ACTIVA TG-MP fornecido pela Ajinomoto Interamericana Co. é viável em concentrações limitadas, devido à presença de outros compostos, como lactose, que em grande quantidade interfere na formação de uma matriz estável e homogênea de filmes protéicos. A alta concentração de lactose na formulação filmogênica influenciou nas propriedades de barreira e mecânicas dos filmes, impedindo a formação de uma matriz filmogênica contínua e com maior número de ligações inter e intramoleculares.

O perfil eletroforético e cromatográfico da reação da transglutaminase em várias concentrações de enzima e tempo de reação indicaram a formação de polímeros de maior e diferentes pesos moleculares, relacionado à ação da enzima nas proteínas do soro de leite, formando a matriz filmogênica.

Filmes protéicos de soro de leite apresentaram barreira moderada à umidade e gases quando comparados ao armazenamento em sistema aberto (sem tampa), nas condições de 25°C e 75% de umidade relativa e 10°C, indicando um grande potencial para a aplicação como embalagem secundária.

Em relação à migração de umidade (perda de peso, teor de umidade e mudança de textura), a aplicação dos filmes protéicos de soro de leite acondicionados a 25°C e 75% de umidade relativa apresentou diferença equivalente a 40 horas no tempo de armazenamento, estando diretamente relacionada à permeabilidade ao vapor d'água dos filmes. Na mesma proporção quanto ao escurecimento enzimático em relação ao do sistema aberto. O armazenamento em temperatura mais baixa (10°C) apresentou diferença nos valores equivalente a 80 horas no tempo de armazenamento quanto à perda de peso, e o escurecimento apresentou melhores valores de a^* com filmes modificados com transglutaminase.

A diferença de peso, teor de umidade e mudança de textura das maçãs acondicionadas entre os diferentes tipos de filmes (padrão, emulsionado e modificado enzimaticamente) não foi estatisticamente significativa em função do tempo de armazenamento, apesar do valor de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes encontrado ter sido diferente. Ou seja, neste tipo de aplicação com alimento com alto teor de umidade, não foi possível detectar esta diferença.

O escurecimento enzimático das maçãs foi evidenciado pelo índice de croma a^* , que aumentou em função do tempo de armazenamento, apresentando diferença em relação ao das amostras acondicionadas em atmosfera modificada com gás N_2 .

CAPÍTULO 10

10 – Referência Bibliográfica

ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.73, n.2, p.256-263, 1990.

AGUILERA, J.M. Gelation of whey proteins. **Food Technology**, Chicago, v.49, n.10, p.83-89, 1995.

AKESON, W.R.; STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation, **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.83, p.257-261, 1964.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A .M. Mechanical properties, water vapor permeability and moisture contents of β -Lg and whey protein films using multivariate analysis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.46, n.5, p.1820-1829, 1998.

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A-M. Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents and glass transitions temperature of whey protein films. **Journal of Agriculture of Food Chemistry**, Washington, v.47, n.5, p.1878-1886, 1999.

ANTUNES, A. J. Edible Films from Milk Proteins. **Annals of the 63rd Annual Dairy and Food Industry Conference**, p.22, Ohio State University, Columbus, OH, 1996.

ANTUNES, A.C.B.; ANTUNES, L.J. Non-linear effects moisture adsorption by chocolate. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.35, n.3, p.323-329, 2000.

ANTUNES, A.C.B.; AVELLAR, I.G.J. Water vapour transmission properties in chocolate. **International Journal of Food Science and Technology** (submitted for publication), 2001.

AOAC **Official Methods of analysis of AOAC International: Food composition, additives, natural contaminants**. 16 ed., Maryland, 1997.

ARVANITTOYANNIS, I.; BILIADERIS, C.G. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. **Food Chemistry**, Oxford, v.62, n.3, p.333-342, 1998.

ARVANITTOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, part 3. **Food Chemistry**, Oxford, v.60, n.4, p.593-604, 1997.

ARVANITTOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.37, n.4, p.371-382, 1998.

ASTM. Standard Test Methods for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting, **ASTM Book of Standards**, Philadelphia, PA, 1995a.

ASTM. Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **Annual Book of ASTM Standards**. American Society for Testing and Materials, D 882, Philadelphia, PA, 1995b.

AVENA-BUSTILLOS, R.J.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.4, p.904-907, 1993.

AYHLLON-MEIXUEIRO, F.; VACA-GARCIA, C.; SILVESTRE, F. Biodegradable films from isolate of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.7, p.3032-3036, 2000.

- AYRANCI, E. Moisture sorption of cellulose-based edible films. **Nahrung**, Berlim, v.40, n.5, p.274-276, 1996.
- AYRANCI, E.; TUNE, S. The effect of fatty acid content on water vapour and carbon dioxide transmissions of cellulose-based edible films. **Food Chemistry**, Oxford, v.72, n.2, p.231-236, 2001.
- BABIKER, E.F.E.; KHAN, M.A.S.; MATSUDOMI, N.; KATO, A. Polymerization of soy protein digests by microbial transglutaminase for improvement of the functional properties. **Food research International**, v.29, n.7, p.627-634, 1996.
- BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O.; BAKER, R.A. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.1, p.35-38, 1995.
- BALDWIN, E.A.; NISPEROS, M.O.; CHEN, X.; HAGENMAIER, R.D. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.9, n.2, p.151-163, 1996.
- BALDWIN, E.A.; NISPEROS, M.O.; HAGENMAIER, R.D.; BAKER, R.A. Use of lipids in coatings for food products. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.6, p. 56-64, 1997.
- BALDWIN, E.A.; BURNS, J.K.; KAZOKAS, W.; BRECHT, J.K.; HAGENMAIER, R.D.; BENDER, R.J.; PESIS, E. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.17, n.3, p. 215-226, 1999.
- BANERJEE, R.; CHEN, H. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.78, n.8, p.1673-1683, 1995.
- BANKER, G.S. Film coating theory and practice. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, v.55, n.1, p.81-89, 1966.
- BEN-YEHOSHUAS, S. Individual seal-packaging of fruit and vegetables in plastic film – a new postharvest technique. **HortScience**, Alexandria, v.20, n.1, p.32-37, 1985.
- BICAN, P.; BLANC, B. Milk protein analysis – a high performance chromatography study. **Milchwissenschaft**, Munique, v.37, n.10, p.592-593, 1982.

- BIQUET, B.; LABUZA, T.P. Evaluation of the moisture permeability characteristics of chocolate films as an edible moisture barrier. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.4, p.989-998, 1988.
- BLUMENTHAL, M.M. How food packaging affects food flavor. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.1, p.71-74, 1997.
- BOLIN, H.R.; HUXSOLL, C.C. Control of discoloration caused by abrasion peeling. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.2, p.416, 1991.
- BOX, G.e.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building**. New York, Wiley, 1978.
- BRANDÃO, T.R.S.; OLIVEIRA, F.A.R.; CUNHA, L.M. Design of experiments for improving the precision in the estimation of diffusion parameters under isothermal and non-isothermal conditions. **International of Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.36, n.3, p.291-301, 2001.
- BRYANT, C.M.; McCLEMENTS, D.J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.9, n.4, p.143-151, 1998.
- CALLEGARIAN, F.; GALLO, J-A. Q.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Lipids and biopackaging. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.74, n.10, p.1183-1192, 1997.
- CARVALHO, R.A. Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina. Campinas (São Paulo): UNICAMP, 1997, 128p. (**Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos**).
- CHEN, P.H.; LIN, J.H.; YANG, M.H. Relationships between the chains flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 24, n.1, p. 41-46, 1994.
- CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.78, n.11, p.2563-2583, 1995.

- CHICK, J.; USTUNOL, Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.6, p.1024-1027, 1998.
- CHINNAN, M.S.; PARK, H.J. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. **Journal of Food Processing Engineering**, Trumbull, v.18, n.4, p.417-429, 1995.
- COUPLAND, J.N.; SHAW, N.B.; MONAHAN, F.J.; O'RIORDAN, D.; O'SULLIVAN, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.43, n.1, p.25-30, 2000.
- CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**. London, Oxford University Press, pp.4, 1975.
- CRUZ, G.V.; TORRES, J.A.; MARTIN-POLO, M.O. Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethycellulose films. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.49, n.1, p.91-94, 2001.
- CUQ, B.; AYAMARD, C.; CUQ, J-L; GUILBERT, S. Edible packaging films on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.6, p.1369-1374, 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**, Chicago, v.61, n.3, p.580-584, 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 of Food Chemistry**, Washington, v.45, n.3, p.622-626, 1997.
- CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.75, n.1, p.1-9, 1998.
- DAMODARAN, S.; ANAND, K. Sulfhydryl-disulfide interchange-induced interparticle protein polymerization in whey protein-stabilized emulsions and its relation to emulsion stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n.10, p.3813-3820, 1997.

DEBEAUFORT, F.; MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A. Polarity Homogeneity an structure affect water vapor permeability of model edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.2, p.426-429, 1993.

DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.30, n.2, p.183-190, 1995.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.-A.; VOILLEY, A. Edible Films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical reviews in Food Science and nutrition**, Boca Raton, v.38, n.4, p.299-313, 1998.

DeWITT, J.N.; KLARENBECK, G. Effects of various treatments on structure and solubility of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2701-2710, 1984.

DICKINSON, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.8, n.10, p.334-339, 1997.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. The effects of solution composition and drying temperature on crystallinity permeability and mechanical properties of methylcellulose films. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v.17, n.4, p.231-246, 1993.

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible Films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A. e NISPEROS-CARRIEDO, M.O. **Edible Coatings and Films to Improve Quality**, Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., p.231-246, 1994.

FÆRGEMAND, M.; MURRAY, B.; DICKINSON, E. Cross-linking of milk proteins with transglutaminase at the oil-water interface. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.45, n.7, p.2514-2519, 1997.

FÆRGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Cross-linking of whey protein by enzymatic oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.4, p.1326-1333, 1998a.

FÆRGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, Oxford, v.8, n.8, p.715-723, 1998b.

FAIRLEY, P.; MONAHAN, F.J.; GERMAN, B B.; KROCHTA, J.M. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and N-ethylmaleimide or cysteine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.12, p.3789-3792, 1996.

FAIRLEY, P.; KROCHTA, J.M.; GERMAN, B J. Interfacial interactions in edible emulsion films from whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.3, p.245-252, 1997.

FALABELLA, M.C.; AGUERRE, R.J.; SUARÉZ, C. Determination of the heat of water sorption by means on eletronic hygrometers. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.22, n.1, p.11-14, 1989.

FENNEMA, O.R. Water and ice. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 2^a ed. Nova lorque: Marcell Dekker Inc, 1985.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Water in milk and dairy products. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, London, 1998.

GALIETTA, G.; GIOIA, L.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermomechanical properties of film based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.81, n.12, p.3123-3130, 1998.

GALLO, J-A. Q.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Interactions between aroma and edible films. 1. permeability of methylcellulose and low-density polyethylene films to methyl ketones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, n.1, p.108-113, 1999.

GALLO, J-A. Q.; DEBEUAFORT, F.; CALLEGARIAN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v.180, n.8, p.37-46, 2000.

- GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKI, N.E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.6, p.941-947, 2000.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. **Food Technology**, Chicago, v.44, n.10, p.63-69, 1990.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. **CFW Cereal Food World Review**, St Paul, v.36, n.12, p.1004-1009, 1991.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; TESTIN, R.F. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.7, n.4, p.426-429, 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 American Society of Agricultural Engineers**, St Joseph, v.36, n.6, p.1867-1872, 1993b.
- GENNADIOS, A.; BRADENBURG, A.H.; WELLER, C.L.; TESTIN, R.F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.41, n.11, p.1835-1839, 1993c.
- GENNADIOS, A.; WELLER, C.L. Moisture adsorption by grains protein films. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, St Joseph, v.37, n.2, p.535-539, 1994.
- GONTARD, N. Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés du gluten. Montpellier: Université Montpellier II, 1991 (tese, Doutorado em Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire – Science des Aliments).
- 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**, Chicago, v.57, n.1, p.190-199, 1992.
- GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J-Q. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.206-211, 1993.

GONTARD, N.; MARCHESSEAU, S.; CUQ, J-L; GUILBERT, S. Water vapour permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.30, n.1, p.49-56, 1995.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-Packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.30, n.1, p.3-15, 1996.

GRANT, L.A.; BURNS, J. Application of coatings. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A. e NISPEROS-CARRIEDO, M.O. **Edible coatings and films to improve food quality**. Lancaster: Technomic Publishing Company Inc, p.189-200, 1994.

GREENSPAN, L. Humidity points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National of Standards**, Washington, v.81A, n.1, p.92-93, 1977.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: MATHLOUTHI, M. **Food Packaging and Preservation: theory and practice**. London: Elsevier H. Science Publishers, p.371-395, 1986.

HAARD, N.F. Foods as cellular systems: impact on quality and preservation. In: TAUB, I.A. e SINGH, R.P **Food Storage stability**. Boca Raton: CRC Press, p.39-88, 1998.

HAGENMAIER, R.D.; SHAW, P.E. Moisture permeability of edible film made with fatty acid and (hydroxipopyl)methylcellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.9, p.1799-1803, 1990.

HAN, X-Q.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.5, p.1211-1217, 1996.

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 sulfidryl groups. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.1, p.82-85, 1999a.

HANDA, A.; GENNADIOS, A.; HANNA, M.A.; WELLER, C.L.; KURODA, N. Physical and molecular properties of egg-white lipid films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.5, p.860-864, 1999b.

- HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L.K.; CAMPANELLA, O.H. Eletrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. **Journal of Dairy Research**, New York, v.65, n.1, p.79-91, 1998.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Contribution of hydrophobicity, net charge and sulfhydryl groups to thermal properties of ovalbumin. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, Ottawa, v.18, n.4, p.290-295, 1985.
- HERALD, T.J.; HACHMEISTER, K.A.; HUANG, S.; BOWERS, J.R. Corn zein packaging materials for cooked turkey. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.2, p.415-417, 1996.
- HERMANSSON, A.M. Functional properties of proteins for foods – water vapour sorption. **Journal of Food Technology**, v.12, p.177-187, 1977.
- HERSHKO, V.; NUSSINOVITCH, A. Physical properties of alginate-coated onion (*Allium cepa*) skin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.12, n.2, p.195-202, 1998.
- HOWARD, L.R.; DEWI, T. Sensory, microbiological and chemical quality of mini-peeled carrots as affected by edible coating treatment. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p.142-144, 1995.
- HUFFMAN, L.M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v.50, n.2, p.49-52, 1996.
- IGLESIAS, H.A.; CHIRIFE, J. Isosteric heats of water vapor sorption on dehydrated foods. Part I. Analyses of the differential heat curves. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.9, n.3, p.116-122, 1976a.
- IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. Equilibrium moisture contents of air dried beef dependence on drying temperature. **Journal of Food Technology**, Chicago, v.11, p.565-573, 1976b.
- IKURA, K.; KOMETANI, T.; YOSHIKAWA, M.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Crosslinking of casein components by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v.44, n.7, p.1567-1573, 1980.
- JAMES, F.; ROOS, M. **MINUIT, function minimization and error analysis**. CERN D506 (Long Writeup). Geneva, Switzerland: CERN Program Library Office, 1989.

- JANGCHUD, A.; CHINNAN, M.S. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.32, n.2, p.89-94, 1999.
- JENKE, D.R. Solute migration through polypropylene blend films. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.44, n.7, p.1223-1231, 1992.
- JOST, R.; BAECHLER, R.; MASSON, G. Heat gelation of oil in water emulsions stabilized by whey protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.51, n.2, p.440-444, 1986.
- JOU, K.D.; HARPER, W.J. Effect of di-saccharides on the thermal properties of whey proteins determined by differential scanning calorimetry (DSC). **Milchwissenschaft**, Munich, v.51, n.9, p.509-512, 1996.
- JOWITT, R.; ESCHER, F.; HALLSTÖM, B.; MEFFERT, H.F.T.; SPIESS, W.E.L.; VOS, G. **Physical Properties of foods**. London and New York: Applied Science Publishers, 1983.
- KAMPER, S.L.; FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible bilayer films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n.6, 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**, Chicago, v.50, n.2, p.382-385, 1985.
- KAPSALIS, J.G. Influences of hysteresis and temperature on moisture sorption isotherms. In: ROCKLAND, L.B.; BEUCHAT, L.R. **Water activity: theory and applications to food**. New York: Institute OF Food Technologists Marcel Dekker Inc., 1987.
- KARATHANOS, V.T.; VILLALOBOS, G.; SARAVACOS, G.D. Comparison of the two methods of estimation of the effective moisture diffusivity from drying data. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.1, p.218-223, 1990.
- KAYA, S.; KAYA, A. Microwave drying effects on properties of whey protein isolate edible films. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.43, n.2, p.91-96, 2000.
- KELLA, N.K.D.; YANG, S.T.; KINSELLA, J.E. Effect of disulfide bond-cleavage on structure and interfacial properties of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.37, n.5, p.1203-1210, 1989.

- KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible Films and coatings: a review. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n.12, p. 47-58, 1986.
- KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Responses Surfaces-Designs and analyses**. New York: ASQC Quality Press, 405pp., 1987.
- KIM, S-J.; USTUNOL, Z. Sensory attributes of whey protein isolate and candellila wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.66, n.6, p.909-911, 2001a.
- KIM, S-J.; USTUNOL, Z. Solubility and moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.9, p.4388-4391, 2001b.
- KING, A.D.; BOLIN, H.R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.43, n.2, p.132-139, 1989.
- KINSELLA, J.E.; WHITEAD, D.M.; BRADY, J.; BRINGE, N.A. Milk proteins: relationships of structure and function. In **Developments in Dairy Chemistry**, vol.4, Elsevier Applied Science, 1982.
- KINSELLA, J.E. Milk protein: physicochemical and functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.21, n.3, p.197-262, 1984.
- KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M. Protein in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food Nutrition Research**, San Diego, v.33, p.343-439, 1989.
- KIRANOUDIS, C.T.; MAROULIS, Z.B.; TSAMI, E.; MARINOS-KOURIS, D. Equilibrium moisture content and heat of desorption of some vegetables. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.20, n.1, p.55-74, 1993.
- KITABATAKE, N.; KINEKAWA, Y-I Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin in vitro and in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.12, p.4917-4923, 1998.
- KOELSCH, C.M.; LABUZA, T.P. Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible barriers. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.25, n.5, p.404-411, 1992.

- KOELSCH, C.M. Edible water vapor barriers: properties and promise. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.51, n.5, p.76-81, 1994.
- KROCHTA, J.M.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.2, p.60-74, 1997.
- LABUZA, T.P.; HYMAN, C.R. Moisture migration and control in multi-domain foods. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.9, n.2, p.47-55, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.15, p.689-685, 1970.
- LERDTHANANGKUL, S.; KROCHTA, J.M. Edible coatings effects on postharvest quality of green bell peppers. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.1, p.176-179, 1996.
- LeTIEN, C.; LATENDRE, M.; ISPAS-SZABO, P.; MATEESCU, G.; DELMAS-PATTERSON, G.; YU, H-L.; LACROIX, M. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linked and entrapment in cellulose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.11, p.5566-5575, 2000.
- LI, P.; BARTH, M.M. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.14, n.1, p.51-60, 1998.
- LI, J.; CHEN, H. Transglutaminase catalyzed crosslinking on functional properties of whey protein-based edible films. In: **1999 IFT Annual Meeting**. 1999, Chicago (USA). IFT Annual Meeting Abstracts. Trabalho n. 79A-6.
- LIEBERMANN, E.R.; GILBERT, S. E. Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture and plasticizer content. **Journal of Polymer Science**, New York, v.41, p.33-43, 1973.
- LIM, L-T; MINE, Y.; TUNG, M. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.10, p.4022-4029, 1998.

- LIM, L-T, MINE, Y.; TUNG, M.A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.4, p.616-622, 1999.
- LOMAURO, C.J.; BAKSHI, A.S.; LABUZA, T.P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: fruit, vegetable and meat products. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, London, v.18, n.2, p.111-117, 1985
- LORENZEN, P.C.; SCHLIMME, E.; ROOS, N. Crosslinking of sodium caseinate by microbial transglutaminase. **Nahrung**, Berlin, v.42, n.3/4, p.151-154, 1998.
- LORENZEN, P.C. Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. **Milchwissenschaft**, Munich, v.55, n.12, p. 667-670, 2000.
- MAHMOUD, R.; SAVELLO, P. A Mechanical properties and water vapor transferability through whey protein films. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.75, n.11, p.942-946, 1992.
- MAHMOUD, R.; SAVELLO, P. A. Solubility and hidrolizability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.76, n.1, p.29-35, 1993.
- MANGINO, M.E. Physicochemical aspects of whey protein functionality. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2711-2722, 1984.
- MARTIN-POLO, M.; MAUGUIN, C.; VOILLEY, A. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. I. Influence of the film preparation technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.40, n.3, p.413-418, 1992.
- MASKAN, M.; GÖGÜS, F. Sorption isotherms and drying characteristics of mulberry (*Morus alba*). **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.37, n.4, p.437-449, 1998.
- MATÉ, J.I.; FRANKEL, E.N.; KROCHTA, J.M. Whey protein isolate edible coatings: effects on the rancidity process of dry roasted peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.7, p.1736-1740, 1996.

MATÉ, J.I.; KROCHTA, J.M. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and β -lactoglobulin edible films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.10, p.3001-3004, 1996a.

MATÉ, J.I.; KROCHTA, J.M. Whey protein coating effect on oxygen uptake of dry roasted peanuts. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.6, p.1202-1206, 1996b.

MATÉ, J.I.; KROCHTA, J.M. Oxygen uptake model for uncoated and coated peanuts. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 35, n.3, p. 299-312, 1998.

MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R. A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable in foods. **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v.11, n.5, p.309-327, 1987.

MATSUMURA, Y.; CHANYONGVORAKUL, Y.; KUMAZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; MORI, T. Enhance susceptibility to transglutaminase reaction of α -lactalbumin in the molten globule state. **Biochemistry and Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1292, n.1, p.69-76, 1996.

MATSUMURA, Y.; LEE, D-S; MORI, T. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.14, n.1, p.49-59, 2000.

MAUER, L.J.; SMITH, D.E.; LABUZA, T.P. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films. **International Dairy Journal**, Oxford, v.10, n.5-6, p.353-358, 2000.

MCCARTHY, M.J.; LASSEUX, D.; MANEVAL, J.E. NMR imaging in the study of diffusion of water in foods. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.22, n.1-4, p.211-224, 1994.

McHUGH, T.H.; AVENA-BUSTILLOS, R.; KROCHTA, J.M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.4, p.899-903, 1993.

McHUGH, T.; KROCHTA, J.M. Sorbitol- vs Glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, n.4, p.841-845, 1994a.

McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Milk-Protein-Based Edible films and coatings. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.1, p.97-108, 1994b.

McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.71, n.3, p.307-312, 1994c.

McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Permeability properties of edible films. In KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O. **Edible Coatings and Films to Improve Quality**, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, 1994d.

McHUGH, T.H.; KROCHTA, J.M. Dispersed phase particle size effects on water vapor permeability of whey protein-beeswax edible emulsion films **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v.18, n.3, p.173-188, 1994e.

McHUGH, T.H.; AUJARD, J.F.; KROCHTA, J.M. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. **Journal of Food Science**, v.59, n.2, p.416-419, 1994.

McHUGH, T.H. Effects of macromolecular interactions on the permeability of composite edible films. In PARRIS, N.; KATO, A.; CREAMER, L.K.; PEARCE, J. **Macromolecular Interactions in Food Technology**, Washington: American Chemical Society, 1996.

McHUGH, T.H. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. **Nahrung**, Berlin, v.44, n.3, p.148-151, 2000.

McHUGH, T.H.; SENESI, E. Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.3, p.480-485, 2000.

MILLER, K.S.; KROCHTA, J.M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.8, n.6, p.228-237, 1997

MILLER, K.S.; UPADHYAYA, S.K.; KROCHTA, J.M. Permeability of d-limonene in whey protein films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.2, p.244-247, 1998.

MORILLON, V.; DEBEAUFORT, F.; CAPELLE, M.; BLOND, G.; VOILLEY, A. Influence of the physical state of water on the barrier properties of hydrophilic and hydrophobic films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.1, p.11-16, 2000.

- MORR, C.V. Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.5, p.1406-1412, 1985.
- MORR, C.V.; HA, Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- MOTOKI, M.; NIO, N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, n.2, p. 561-566, 1983.
- MOTOKI, M.; NIO, N.; TAKINAMI, K. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v.48, n.5, p.1257-1261, 1984.
- MOTOKI, M.; ASO, H.; SEGURO, K.; NIO, N. α_{S1} -casein film prepared using transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v.51, n.4, p.993-996, 1987.
- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.9, n.5, p.204-210, 1998.
- MYERS, R.A. Packaging considerations for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v.43, n.2, p.129-131, 1989.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. Unicamp, pp.401, 2001.
- NICOLI, M.C.; ANESE, M.; SEVERINI, C. Combined effects in preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruit. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v.17, n.3, p.221-229, 1994.
- NIELSEN, S.S. Digestibility of legume proteins. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.9, p.12-118, 1995.
- NIO, N.; MOTOKI, M.; TAKINAMI, K. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. **Agricultural of Biological and Chemistry**, Tokio, v.50, n.4, p.851-855, 1986.

- NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. Polymerization of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v.53, n.10, p.2619-2623, 1989.
- NONAKA, M.; MATSUURA, Y.; NAKANO, K.; MOTOKI, M. Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using Ca²⁺-independent microbial transglutaminase with gelatin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.11, n.3, p.347-349, 1997.
- NOREÑA, C.Z.; HUBINGER, M.D.; MENEGALLI, F.C. Técnicas básicas de determinação de atividade de água: uma revisão. **Boletim SBCTA**, v.30, n.1, p. 91-96, 1996.
- NUSSINOVITCH, A.; HERSHKO, V. Gellan and alginate vegetable coatings. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.30, n.2-3, p.185-192, 1996.
- OKAMOTO, S. Factors affecting protein film formation. **Cereal Foods World**, St. Paul, v.23, n.5, p.256-262, 1978.
- OKAMOTO, S.; TAISHIDO, S. Factors affecting protein film formation. **American Association of Cereal Chemistry**, St. Paul, v.23, n.5, p.256-262, 1978.
- OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; PIETTE, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R.A. Diffusion of acetic and propionic acid from chitosan-based antimicrobial packaging films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.5, p.768-773, 2000.
- OZDEMIR, M.; FLOROS, J.D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.47, n.2, p.149-155, 2001.
- 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**, Chicago, v.58, n.6, p.1361-1370, 1993.
- PARK, H.; CHINNAN, M. S. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.25, n.4, p.497-507, 1995.

- PARK, H.J. Development of advanced edible coating for fruits. **Trends in Food Science & Technology**, London, v.10, n.8, p.254-260, 1999.
- PARK, J.W.; TESTIN, R.F.; PARK, H.J.; VERGANO, P.J.; WELLER, C.L. Fatty acid concentration effect on tensile strength, elongation, and water vapor permeability of laminated edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.4, p.916-919, 1994.
- PENNISI, E. Sealed in edible film. **Science News**, Washington, v.141, p.12, 1992.
- PEPPAS, N.A. Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.22, n.1-4, p.189-210, 1994.
- PEPPAS, N.A.; BRANNON-PEPPAS, L. Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.22, n.1-4, p.189-210, 1994.
- PÉREZ-GAGO, M.B.; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.4, p.695-698, 1999.
- PÉREZ-GAGO, M.B.; NADAUD, P. ; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat-desaturated *versus* native whey protein films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.6, p.1034-1037, 1999.
- PÉREZ-GAGO, M.B.; KROCHTA, J.M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.7, p.2687-2692, 2000.
- PÉREZ-GAGO, M.B.; KROCHTA, J.M. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.66, n.5, p.705-710, 2001.
- PHILLIPS, L.G.; WHITEHEAD, D.M.; KINSELLA, J. Effects of modification on the structure-function relationships of food proteins. In: **Structure-function properties of food proteins**, San Diego: Academic Press, p.205-232, 1994.
- POOLE, P.L.; FINNEY, J.F. Sequential hydration of dry globular protein. **Biopolymers**, New York, v.22, n.9, p.255, 1983.

- REDL, A.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Determination of sorbic acid diffusion in edible wheat gluten and lipid based films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.1, p.116-120, 1996.
- 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, p.149-152, 1999.
- RICH, L.M.; FOEGEDING, E.A. Effects of sugars on whey protein isolate gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.10, p.5046-5052, 2000.
- RIZVI, S.S.H. Thermodynamic properties of food in dehydration. In: RAO, M.A.; RIZVI, S.S. **Engineering properties of Foods**, New York: Marcel Dekker Inc., p. 265-279, 1995.
- ROBERTSON, G.L. Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers. In ROBERTSON, G.L. **Food packaging: principles and practice**. Nova Iorque: Marcell Dekker Inc., 1993.
- ROGERS, C.E. Permeation of gases and vapours in polymers. In: COMYN, J. **Polymer permeability**. London e New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.
- ROLE, R.S.; CHISM III, G.W. Physical consequences of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v.10, n.3, p.157-177, 1987.
- ROY, S.; WELLER, C.L.; GENNADIOS, A.; ZEECE, M.G.; TESTIN, R.F. Physical and molecular properties of wheat gluten films cast from heated film-forming solutions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n.1, p. 57-60, 1999.
- SABATO, S.F.; OUATTARA, B.; YU, H.; D'APRANO, G.; Le TIEN, C.; MATEESCU, M.A.; LACROIX, M. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.3, p.1397-1403, 2001.
- SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; TOIGUCHI, S.; SEGURO, K.; SOEDA, T.; MOTOKI, M. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.2, p.300-304, 1995.

SANTOSA, F.X.B.; PADUA, G.W. Tensile properties and water absorption of corn zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n.5, p.2070-2074, 1999.

SAPERS, G.M.; DOUGLAS JR, F.W. Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1258-1262, 1987.

SAPERS, G.M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n.10, p.74-84, 1993.

SAPRU, V.; LABUZA, T.P. Dispersed phase concentration effect on water vapor permeability in composite methyl cellulose-stearic acid edible films. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v.18, n.5, p.359-368, 1994.

SARAVACOS, G.D. Mass transfer properties of foods. In: RAO,M.A.; RIZVI, S.S.H. **Engineering properties of foods**. New York: Marcel Dekker Inc, 1995.

SCHNEPF, M. Protein-water interactions. In: HARDMAN, .T.M. **Water and Food Quality**. England: Elsevier Science Publishers, p.135-168, 1989.

SCHORSCH, C. CARRIE, H.; CLARK, A.H.; NORTON, I.T. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. **International Dairy Science**, Oxford, v.10, n.8, p. 519-528, 2000.

SHELLHAMMER, T.H.; KROCHTA, J.M. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.2, p.390-398, 1997.

SHERWIN, C.P.; SMITH, D.E.; FULCHER, G. Effect of fatty acid type on dispersed phase particle size distribution in emulsion edible films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n.11, p. 4534-4538, 1998.

SHEWFELT, R.L. Quality of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v.10, n.3, p.143-156, 1987.

SHIMIZU, M.; SAITO, M.; YAMAUCHI, K. Emulsifying and structural properties of β -lactoglobulin at different pHs. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v.49, p.189-194, 1985.

SOLIVA-FORTUNY, R.C.; GRIGELMO-MIGUEL, N.; ODRIZOLA-SERRANO, I.; GORINSTEIN, S. ; MARTIN-BELLOSO, O. Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, n.8, p.3685-3690, 2001.

SON, S.M.; MOOND, K.D. ; LEE, C.Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, Oxford, v.73, n.1, p.23-30, 2001.

SOTHORNVIT, R. ; KROCHTA, J.M. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.4, p.700-703, 2000.

SPIEGEL, T. Whey protein aggregation under shear conditions-effects of lactose and heating temperature on aggregate size and structure. **International Journal of Food Science**, Oxford, v.34, n.5/6, p.523-531, 1999.

STUCHELL, Y.M.; KROCHTA, J.M. Edible coatings on frozen king salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p. 28-31, 1995.

SZCZESNIAK, A.S. Effect of storage on texture. In: TAUB, I.A.; SINGH, R.P. **Food Storage stability**. Boca Raton: CRC Press, p.191-244, 1998.

THEODOROU, D.N. Molecular simulations of sorption and diffusion in amorphous polymers. In: NEOGI, P. **Diffusion in Polymers**. New York: Marcell Dekker Inc., 1996.

VACHON, C.; YU, H-L; YEFSAH, R.; ALAIN, R.; GELAIS, D.; LACROIX, M. Mechanical and structural properties of milk protein edible films cross-linked by heating and γ -irradiation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n.8, p.3202-3209, 2000.

VAROQUAUX, P.; VAROUQUAUX, F.; BREULIS, G. Browning potential of various cichrorim-endua L. cultivar as a function of harvest time. **Food Science and technology – Lebensmittel-Wissenschaft**, London, v.24, n.3, p.2070-273, 1991

- VICENTINI, N.M.; CASTRO, T.M.R.; CEREDA, M.P. Influência de películas de fécula de mandioca na qualidade pós-colheita de frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.1, p.127-130, 1999.
- VILLEGAS, A.M.; GONZÁLES, A.; CALDERÓN, R. Microbiological and enzymatic evaluation of sesame protein. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.45, n.5, p.379-385, 1968.
- WALL, J.S.; BECKWITH, A. C. Relationship between structure and rheological properties of gluten proteins. **Cereal Science Today**, St. Paul, v.14, n.1, p.16, 1969.
- WATT, I.C. The theory of water sorption by biological materials. In: JOWITT, R.; ESCHER, F.; HALLSTÖM, B.; MEFFERT, H.F.T.; SPIESS, W.E.L.; VOS, G. **Physical Properties of foods**. England: Applied Science Publishers, 1983.
- WHITAKER, J.R. Enzymatic modification of proteins applicable to food. In: **Food proteins:improvement through chemical and enzymatic modification**. Washington, Edr. Advanced Chemical Series, p.95-160, 1977.
- WILES, J.L.; VERGANO, P.J.; BARRON, E.H.; BUNN, J.M.; TESTIN, R.F. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.65, n.5, p.1175-1179, 2000.
- WONG, D.W.S.; TILLIN, S.J.; HUDSON, J.S.; PAVLATH, A.E. Gas exchange in cut apples with bilayer coatings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, n.10, p.2278-2285, 1994.
- WU, L.C.; BATES, R.P. Influence of ingredients upon edible protein-lipid film characteristics. **Journal of Food Science**, Chicago, v.38, n.5, p.783-787, 1973.
- YANG, L.; PAULSON, A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research Intenational**, Amsterdan, v.33, n.7, p.571-578, 2000a.
- YANG, L.; PAULSON, A.T. Mechanical and water vapour barriers properties of edible gellan films. **Food Research International**, Amsterdan, v. 33, n.7, p.563-570, 2000b.

- YILDIRIM, M. HETTIARACHCHY, N.S.; KALAPATHY, U. Properties of films from cross-linking whey protein isolate and soybean 11S globulin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.6, p.1129-1131, 1996.
- YILDIRIM, M.; HETTIARACHCHY, N.S. Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n.2, p.248-252, 1998.
- ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase-a review of its production and application food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.44, n.3-4, p.277-282, 1995.
- ZIRBEL, F.; KINSELLA, J.E. Factors affecting the rheological properties of gels made from whey protein isolate. **Milchwissenschaft**, Munich, v.43, n.11, p.691-694, 1988.
- ZUTARA, M.; RIZVI, S.; CHEN, H. Characterization of composite-low pH edible films made from whey protein concentrate and different milkfat fractions. **IFT Annual meeting**, 1998.