

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

SIMONE ZULPO

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DA INFLUÊNCIA DO pH E DO
TWEEN 80 EM FILMES DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2015**

SIMONE ZULPO

**ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DA INFLUÊNCIA DO pH E DO TWEEN
80 EM FILMES DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Tecnológica
Federal do Paraná – UTFPR – *Campus*
Pato Branco para obtenção do Título de
Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Teixeira
Marques

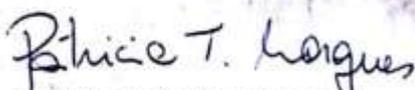
Pato Branco - PR

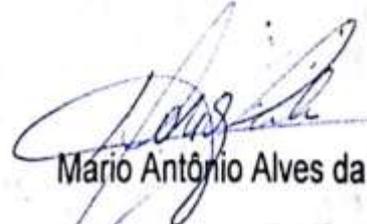
2015

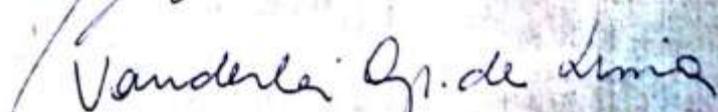
TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Análise quimiométrica da influência do pH e do Tween80 em filmes de proteína de soro de leite** foi considerado **APROVADO** de acordo com a ata da banca examinadora N° **9.1.2015-B** de 2015.

Fizeram parte da banca os professores.


Patricia Teixeira Marques


Mário Antônio Alves da Cunha


Vanderlei Aparecido de Lima

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, meu refúgio e fortaleza, que em todo o momento esteve segurando em minhas mãos, me fortalecendo e me ajudando nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, Ivone Terezinha Weber, que com o seu esforço e dedicação, me ensinou a ser persistente e batalhadora.

À Professora Dr^a. Patrícia Teixeira Marques, por sua orientação, por sua dedicação, e por ter estado tão presente durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À Professora Dr^a. Cristiane R. Budziak Parabocz, pela oportunidade de ter desenvolvido pesquisa de Iniciação Científica quando ainda estava em meus primeiros passos na Química.

Ao Professor Dr. Márcio Barreto Rodrigues, pela oportunidade de ter desenvolvido atividades de Monitoria de Analítica II, a qual contribuiu para melhor desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de graduação sanduíche no exterior.

À equipe do Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, campus Francisco Beltrão, que cedeu os materiais necessários para as análises mecânicas empregadas neste projeto.

À equipe do Departamento de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, campus Pato Branco, que auxiliaram na análise microscópica dos filmes.

À todos os professores da Coordenação de Química - COQUI, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço à todos os familiares e amigos que com palavras de conforto e motivação, contribuíram para a finalização desta pesquisa.

EPÍGRAFE

"As possibilidades são limitadas apenas pela nossa imaginação e determinação, e não pela física."

Mike Duke

RESUMO

Zulpo, Simone. Análise quimiométrica da influência do pH e do Tween 80 em filmes de proteína de soro de leite. 2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

O impacto ambiental causado pelas embalagens sintéticas e pelo descarte inadequado de resíduos industriais na natureza têm sido um dos assuntos mais comentados nos tempos atuais. Na tentativa de diminuir estes impactos ambientais, novos materiais com menor potencial poluidor vêm sendo estudados na elaboração de plásticos biodegradáveis. O objetivo deste trabalho é utilizar as proteínas presentes no soro de leite, resíduo da indústria de laticínios, para elaboração de filmes biodegradáveis, a partir de tratamentos combinados sob diferentes pHs e concentrações de Tween 80. Os parâmetros pH e concentração de Tween 80 no processo de obtenção de filmes a base de proteína de soro de leite foram estudados no presente trabalho em função da influência deste na qualidade do filme produzido. Os filmes foram caracterizados quanto à quantidade inicial de soro de leite, solubilidade em água, propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. Um planejamento experimental fatorial 2^2 foi utilizado para verificar a influência do pH (5,5, 7,0 e 8,5) e da concentração de Tween 80 (0, 4,5 e 9%) nas propriedades dos filmes. Os filmes com pH 5,5 apresentaram agregados de partículas não dissolvidas distribuídas por todo o filme. Os filmes com pH 7,0 apresentaram-se descontínuos com vários espaços vazios que naturalmente se formaram durante a etapa de secagem. Somente os filmes com pH 8,5 apresentaram textura homogênea. O pH foi a única variável que influenciou significativamente nas propriedades mecânicas dos filmes. Filmes com pH 8,5 obtiveram a maior porcentagem de alongação, 30,64%, e resistência à ruptura, 1,28 MPa. Quanto a solubilidade dos filmes, a interação entre o pH e o Tween 80 exerceu influência significativa, o filme com pH 8,5 e ausência de Tween 80 apresentou a menor solubilidade. Não foi possível avaliar a influência do pH e do Tween 80 quanto as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes, pois estes apresentaram rachaduras no momento da análise.

Palavras-chave: filmes biodegradáveis, soro de leite, pH e Tween 80.

ABSTRACT

Zulpo, Simone. A pH and Tween 80 based chemometric analysis on whey protein films. 2015. 49f. Final Project (Bachelor of Science in Chemistry) - Federal Technological University of Parana. Pato Branco, 2015.

The environmental impact caused by synthetic packaging and inadequate waste disposal have been one of the major concerns in the current world. As a result, new materials with lower potential pollutant have been studied in order to produce biodegradable packaging. The aims of this research is to produce biodegradable films based on whey protein at different pHs and concentration of Tween 80. Films were characterized upon whey protein initial concentration, mechanical properties, water solubility, and water vapor permeability. A statistical experimental design 2^2 was used to verified the significant effect of pH (5.5, 7.0, and 8.5) and Tween 80 concentration (0, 4.5, and 9%) upon said properties. Films at pH 5.5 showed aggregates of particles not soluble distributed on the surface of the films while films at pH 7.0 showed several holes that were naturally produced during water evaporation. Films with pH 8.5 were the ones that showed a homogeneous texture. The variable pH was the unique variable that had a significant effect on mechanical properties of the films. Films at pH 8.5 showed the greatest percent elongation, 30.64%, and the greatest breakage resistance, 1.28 MPa. The interaction between pH and Tween 80 had a significant influence on solubility of the films. The lower values of solubility were related to pH 8.5 and absence of Tween 80. It was not possible to verified the effect of pH and Tween 80 upon water vapor properties of the films because they showed cracks when the analyses were run.

Keywords: biodegradable film, whey protein, pH, and Tween 80.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores reais e codificados para os fatores pH e concentração de Tween 80 utilizados no delineamento experimental para elaboração de biofilmes a base de soro de leite.....	23
Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 utilizado no delineamento experimental para elaboração de biofilmes a base de soro de leite.....	24
Tabela 3 - Resultados dos ensaios preliminares para a elaboração de biofilmes a base de soro de leite.	28
Tabela 4 - Resultados do planejamento experimental 2^2 para o teste de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.	30
Tabela 5 - Análise da influência do pH e Tween 80 na solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.	31
Tabela 6 - Resultados do planejamento experimental 2^2 para os testes mecânicos dos biofilmes a base de soro de leite.	35
Tabela 7 - Análise da influência do pH e Tween 80 na elongação dos biofilmes a base de soro de leite.	36
Tabela 8 - Análise da influência do pH e Tween 80 na resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ligação Peptídica entre dois aminoácidos	17
Figura 2 - Estruturas organizacionais das proteínas	18
Figura 3 - Desnaturação das proteínas	18
Figura 4 - Fórmula estrutural do glicerol	20
Figura 5 - Fórmula estrutural do Tween 80	21
Figura 6 - Procedimento de elaboração dos biofilmes a base de soro de leite.....	23
Figura 7 - Célula utilizada na análise das propriedades de barreira a vapores de água dos biofilmes a base de soro de leite	26
Figura 8 - Biofilmes com 1,25, 2,50 e 5,00 gramas de soro de leite nos pHs 5,5 e 8,5.....	28
Figura 9 - Biofilme com 5 gramas de soro de leite e 20% de glicerol	29
Figura 10 - Gráfico de Pareto para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite...31	
Figura 11 - Micrografias de biofilmes a base de soro de leite contendo 2 % de Tween 80 em pH 5,5 (a) e pH 8,5 (b)	32
Figura 12 - Gráfico de valores preditos e observados para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite	33
Figura 13 - Gráfico de superfície de resposta em 3D para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite	34
Figura 14 - Gráfico de superfície de resposta em 2D para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite	34
Figura 15 - Gráfico de Pareto para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite	37
Figura 16 - Gráfico de Pareto para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite.....	37
Figura 17 - Biofilme com pH 7,0 e Tween 80 (a), pH 5,5 sem Tween 80 (b) pH 5,5 com Tween 80 (c), pH 8,5 sem Tween 80 (d) pH 8,5 com Tween 80 (e)	38
Figura 18 - Gráfico de valores preditos e observados para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite	39
Figura 19 - Gráfico de valores preditos e observados para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite	39
Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta em 3D para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite	40
Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta em 2D para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite	40

Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta em 3D para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite41

Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta em 2D para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 EMBALAGENS.....	15
3.2 EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS - BIOFILMES.....	16
3.3 SORO DE LEITE.....	17
3.4 PROTEÍNAS.....	18
3.5 PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS	20
3.6 GLICEROL.....	21
3.7 TWEEN 80.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 SORO DE LEITE.....	23
4.2 ENSAIOS PRELIMINARES – Elaboração de biofilmes a base de soro de leite e avaliação do aspecto físico dos biofilmes	23
4.3 ELABORAÇÃO DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE	23
4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ²	24
4.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	25
4.6 PROPRIEDADES DE BARREIRA A VAPORES DE ÁGUA	26
4.6.1 Permeabilidade e Transmissão a Vapores de Água.....	26
4.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS	27
4.7.1 Elongação e Resistência à Tração na Ruptura	27
4.8 MICROSCOPIA.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES – Elaboração de biofilmes a base de soro de leite e avaliação do aspecto físico dos biofilmes.....	29
5.2 SOLUBILIDADE EM ÁGUA.....	31
5.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	36
5.3.1 Elongação e Resistência à Tração na Ruptura	36
5.4 PROPRIEDADES DE BARREIRA.....	43
5.4.1 Permeabilidade e Transmissão a Vapores de Água.....	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
7 REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As taxas de crescimento populacional criaram a necessidade de produção de alimentos em larga escala. Para tanto, foram desenvolvidas embalagens para preservar as características físicas, sensoriais, nutricionais e sanitárias dos alimentos durante o período de estocagem, transporte e comercialização (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

Apesar de apresentarem propriedades mecânicas e de barreira muito satisfatórias, as embalagens convencionais são elaboradas a partir de substâncias que se degradam lentamente, causando um enorme impacto ambiental. Além disso, a grande problemática da utilização dessas embalagens também está relacionada com o descarte inadequado e com a exploração de matérias-primas não renováveis (SILVA; LEITE, 2010).

Levando em consideração as questões apresentadas anteriormente, torna-se cada vez mais necessário promover pesquisas com o intuito de diminuir os impactos ambientais e ao mesmo tempo favorecer o crescimento econômico do país. A fim de promover tais melhorias, o gerenciamento de resíduos e o reaproveitamento são umas das soluções mais discutidas nos tempos atuais. O enfoque envolve a transformação de resíduos em subprodutos, agregando valor a um material que demandaria tratamento ou seria simplesmente lançado em solos e rios.

Neste sentido, há um grande interesse em utilizar resíduos da indústria láctea na elaboração de filmes biodegradáveis, com propriedades mecânicas e de barreiras próximas a dos filmes plásticos convencionais.

O objetivo desse estudo é utilizar as proteínas ainda presentes no soro de leite, resíduo da indústria láctea, para elaboração de filmes biodegradáveis com diferentes valores de pH adicionados de agentes plastificante e surfactante, bem como avaliar sua solubilidade e suas propriedades mecânicas e de barreira à vapores de água.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver filmes biodegradáveis a base de soro de leite e avaliar o efeito do pH, e do Tween 80 na solubilidade e nas propriedades mecânicas e de barreira a vapores de água dos filmes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de proteína a ser utilizada nos filmes de soro de leite.
- Elaborar filmes biodegradáveis a base de soro de leite com adição de glicerol sob diferentes níveis de pHs e Tween 80.
- Caracterizar os filmes biodegradáveis quanto à solubilidade em água, permeabilidade, transmissão a vapores de água, tensão e alongação na ruptura.
- Avaliar o efeito da variação do pH e Tween 80 nos filmes biodegradáveis a partir de planejamento fatorial 2².

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EMBALAGENS

A embalagem está presente na história da humanidade desde o início da civilização humana, visto que a prática de embalar surgiu em meio às necessidades básicas de alimentação. A necessidade de conservação dos alimentos surgiu mais tarde, no momento em que devido ao crescimento da população das tribos, os povos antigos passaram a viver em moradias fixas ao invés de se mover de acordo com a disponibilidade de alimento em determinadas regiões. Neste cenário, além de plantar e colher era necessário transportar e armazenar os alimentos, a fim de conservá-los em tempos de escassez (NEGRÃO; CAMARGO, 2008).

As primeiras embalagens foram feitas a partir de cascas de frutos, folhas, couro e entranhas de animais, mais tarde com o desenvolvimento tecnológico o papel de papiro, o metal fundido, e o vidro passaram a ser utilizados para embalagem (ALBUQUERQUE et al., 1994; NEGRÃO; CAMARGO, 2008).

Outras matérias primas e técnicas mais sofisticadas passaram a ser utilizadas com a descoberta das propriedades de novos materiais. Em 1892, por exemplo, pesquisadores desenvolveram um método para a solubilização da celulose, essa descoberta foi estudada mais a fundo e a técnica empregada foi aprimorada, até que em 1911 foi construída a primeira máquina de produção de filme contínuo de celulose transparente (ALBUQUERQUE et al., 1994).

Hoje em dia, os derivados petroquímicos, como poliésteres e poliamidas são os mais utilizados na produção de embalagens plásticas. Isto porque estas matérias primas conferem baixo custo, resistência térmica, mecânica e de barreira à água, satisfatórias ao produto final (THARANATHAN, 2003).

No entanto, os plásticos derivados do petróleo degradam-se de forma lenta, acumulando-se nos aterros sanitários. Por isso, um dos problemas que acometem o meio ambiente é a poluição ocasionada pelo descarte de embalagens sintéticas sem nenhum controle (SILVA et al., 2007). Segundo a Associação Mineira de Defesa do Ambiente - AMDA (2015), os sacos plásticos são responsáveis por cerca de 15 a 20% do volume dos aterros e podem levar até 300 anos para se decompor.

O impacto ambiental causado pelas embalagens sintéticas não diz respeito apenas à destinação da embalagem após seu uso, mas está também relacionado a exploração de matérias-primas não renováveis utilizadas na sua confecção (SILVA; LEITE, 2010). A Associação Mineira de Defesa do Ambiente - AMDA (2015) ainda cita alguns impactos ambientais gerados no momento de extração e refino do petróleo, tais como: contaminação de águas e solos por vazamentos, geração de efluentes líquidos, gasosos e resíduos sólidos, e emissão dos gases causadores do efeito estufa.

Neste contexto, várias pesquisas utilizando materiais biodegradáveis, tais como amido de pinhão (LUCHESE et al., 2015), farinha de arroz (DIAS et al., 2010), amido de milho (GHASEMLOU et al., 2013), quitosana (LECETA et al., 2015), entre outros, vem sendo desenvolvidas na tentativa de substituir as embalagens sintéticas por embalagens biodegradáveis.

3.2 EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS – BIOFILMES

Biofilme é um filme fino preparado a partir de materiais biológicos, como proteínas, polissacarídeos, lipídios e derivados, que age como barreira a elementos externos, protegendo o produto embalado de danos físicos e biológicos, aumentando a sua vida útil (HENRIQUE et al., 2008). Estes biofilmes, embalagens biodegradáveis, são degradados a partir da ação de microorganismos decompositores presentes no solo (BARDI; ROSA, 2007). A degradação microbiológica além de acontecer naturalmente, ainda pode resultar na formação de biogás (metano e hidrogênio) que pode ser utilizado como fonte de energia (PETERSEN et al., 1999).

O processo mais utilizado na formação de biofilmes é o *casting*, palavra inglesa que significa moldagem. Essa técnica consiste em solubilizar a matéria prima e aditivos em água sob aquecimento, os filmes então se formam depois que a solução é acondicionada em um suporte e seca para evaporação do solvente (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; QUINTERO; SOBRAL, 2000).

Além de serem biodegradáveis, os biofilmes podem ser adaptados para impedir que a umidade e o oxigênio entrem em contato com o produto. Dessa

forma aditivos são implementados na formulação dos filmes de modo que suas propriedades possam ser alteradas com o intuito de ajustá-los a determinada finalidade de uso (BOURTOOM, 2008). Entre os aditivos geralmente utilizados encontram-se os plastificantes como glicerol e sorbitol, agentes aromatizantes e antimicrobianos (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.3 SORO DE LEITE

O soro de leite é a porção aquosa que se separa da massa durante a fabricação convencional de queijos. A fabricação do queijo é basicamente um processo de concentração do leite, no qual parte dos componentes sólidos, principalmente proteínas e gorduras são retidos na coalhada enquanto a lactose e os sólidos solúveis são removidos no soro (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Neste processo, uma parte das proteínas do leite não se precipita, sendo removidas juntamente com o soro. Pelo fato de apresentar proteínas de alto valor biológico, o soro de leite é utilizado pelas indústrias alimentícias na produção de bebidas lácteas, soros concentrados (suplementos alimentares para atletas), e soro para alimentação animal e para produção de ricota (MACHADO; SILVA; FREIRE, 2001), tornando-se um subproduto da indústria do queijo.

No entanto, uma pesquisa feita nos laticínios do Estado do Paraná mostra que apenas 19,4% do soro de leite é utilizado em produtos alimentícios, restando 80,6% desse derivado lácteo para ser aproveitado (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001). Esta quantidade de soro sem aplicação é descartada na forma de resíduo industrial, causando um grave problema ambiental (YOSHIDA; ANTUNES, 2009).

O excesso de matéria orgânica nos rios diminui a concentração de oxigênio dissolvido, ocasionando a decomposição anaeróbica da matéria orgânica por microrganismos. Esse processo diminui o pH da água e libera gases tóxicos, tais como dióxido de carbono e metano, que prejudicam a vida aquática, ocasionando um desequilíbrio ambiental muito grave (CETESB, 2015).

3.4 PROTEÍNAS

As proteínas são polímeros lineares formados por moléculas de α - aminoácidos que são unidos entre si por ligações peptídicas (KOOLMAN, 2005, p. 66). Conforme observado na Figura 1, os α -aminoácidos são caracterizados por possuir um átomo de carbono central onde estão ligados um grupo $-NH_2$ (amino primário), $-COOH$ (grupo carboxílico), um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (R) distinta para cada aminoácido (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009).

Na Figura 1, apresenta-se a ligação entre dois aminoácidos onde ocorre a hidrólise, perda de água, e formação de ligações peptídicas, o produto formado neste caso é um dipeptídeo. A ligação amídica formada entre pelo menos dois aminoácidos é a ligação peptídica existentes em todas proteínas conhecidas atualmente.

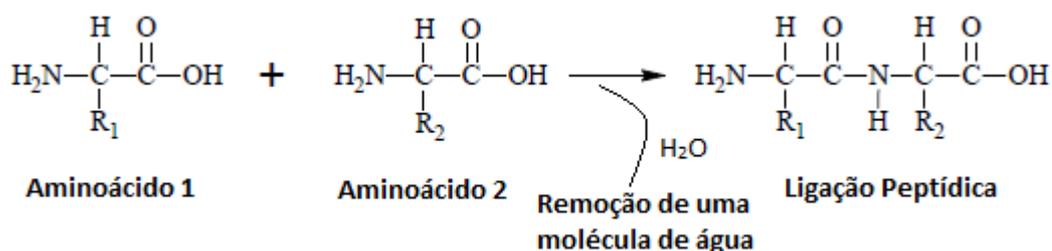


Figura 1 – Ligação Peptídica entre dois aminoácidos.
Fonte: Adaptado de Motta (2015).

As proteínas possuem quatro níveis de organização, denominados estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Em cada nível destas organizações ocorrem, respectivamente, a formação das ligações peptídicas, formação de estruturas α -hélices e/ou folhas pregueadas estabilizadas por ligações de hidrogênio, formação de uma estrutura tridimensional estabilizada por interações não-covalentes (pontes de dissulfeto, interações iônicas e ligações de hidrogênio) e rearranjo espacial da estrutura tridimensional a fim de obter estabilidade (NELSON; COX, 2002; MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2007 pag 29-38). A representação esquemática destas estruturas é apresentada na Figura 2.

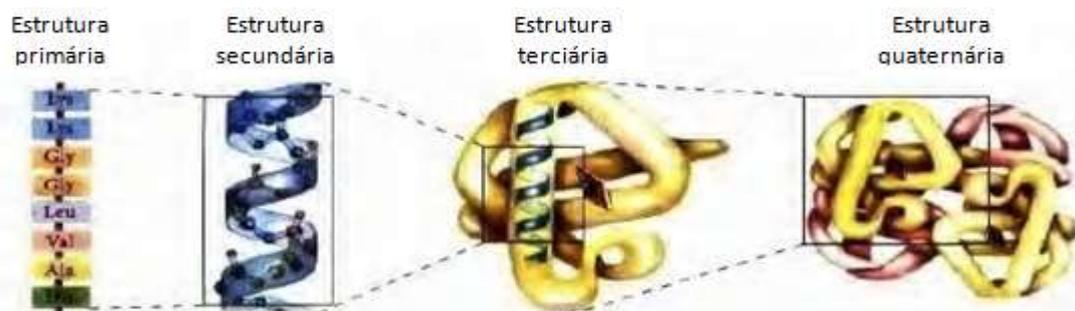


Figura 2 - Estruturas organizacionais das proteínas.
Fonte: Nelson; Cox (2002).

As interações não-covalentes que mantêm a estrutura tridimensional das proteínas são fracas, por isso podem ser rompidas facilmente, ocorrendo um processo de desdobramento da estrutura protéica chamado de desnaturação. As proteínas podem ser desnaturadas de diversas formas tais como, aquecimento e variação de pH (CAMPBELL; FARRELL, 2011, p. 107).

O aquecimento faz a velocidade de vibração molecular aumentar, desfazendo a estrutura terciária das proteínas. Neste procedimento ocorre a perda total ou parcial da estrutura tridimensional sem romper as ligações peptídicas, a qual resulta em perda da atividade biológica e desnaturação das proteínas (MOTTA, 2015).

Em diferentes pHs tanto altos como baixos, pelo menos algumas cargas das proteínas estão faltando, assim as interações eletrostática que estabilizariam a estrutura da proteína são drasticamente reduzidas, levando a desnaturação (CAMPBELL; FARRELL, 2011, p. 108). Este procedimento de desnaturação é ilustrado na Figura 3.

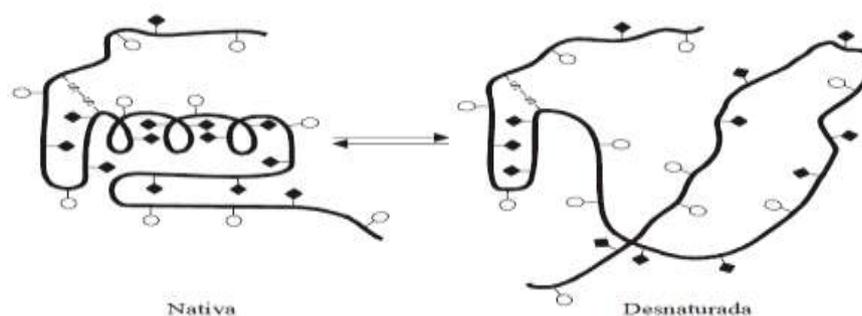


Figura 3 – Desnaturação das proteínas.
Fonte: Motta (2015).

Neste momento, quando a proteína se desnatura em meio aquoso, ocorre a formação de uma solução ligeiramente filmogênica que após secagem em placa de Petri forma um filme. Com o intuito de aproveitar esta propriedade filmogênica em empregos tecnológicos, estudos tais como aqueles desenvolvidos por Ramos et al. (2013) e Azevedo et al. (2014), vêm sendo realizados na tentativa de elaborar plásticos biodegradáveis a partir de proteínas de soro de leite.

3.5 PONTO ISOELÉTRICO DAS PROTEÍNAS

O ponto isoelétrico também chamado de pH isoelétrico (pI) das proteínas é aquele em que a molécula encontra-se eletricamente neutra, neste momento o número de cargas positivas iguala-se ao número de cargas negativas (MURRAY, 2007). No pH isoelétrico os radicais de mesma carga se repelem, fazendo com que a solubilidade das proteínas no pH isoelétrico seja menor do que em outros valores de pH (MARZZOCO; TORRES, 1999, p. 27).

Para cada tipo de proteína existe um determinado valor de pH no qual as cargas se igualam, no entanto, devido a complexidade das estruturas das proteínas esse valor não é obtido teoricamente, mas a partir de experimentos nos quais as proteínas em diferentes valores de pH são submetidas a um campo elétrico, determinando-se como pH isoelétrico, o pH no qual as proteínas não se movem em resposta ao campo aplicado (MARZZOCO; TORRES, 1999, p. 27).

O soro de leite não é constituído de uma proteína pura, mas de uma mistura de proteínas, dentre elas estão a Betalactoglobulina responsável por cerca de 55% da composição do soro de leite bovino e a Lactoalbumina responsável por cerca de 20% da composição do mesmo (WIT, 1998). Embora a Betalactoglobulina seja a principal proteína do soro, devido a presença de várias proteínas com pH isoelétrico diferente, a solubilidade mínima do soro de leite não está em pH 5,2 (pH isoelétrico da Betalactoglobulina), mas em pH 4,5 (PELEGRINE; GASPARETTO, 2003).

Pelo fato de as proteínas apresentarem diferentes cargas eletrostáticas em diferentes valores de pH, as propriedades dos filmes de proteínas do soro de leite se alteram. Estudos desenvolvidos recentemente mostram que a permeabilidade ao

vapor de água dos filmes diminui e a porcentagem de alongação aumenta com o aumento do pH (SOARES, 2012).

3.6 GLICEROL

O glicerol também conhecido como glicerina é um tri-álcool com três carbonos, seu nome segundo a IUPAC é propano - 1,2,3 - triol, é um líquido incolor, sem cheiro, com gosto adocicado e extremamente viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. Seu nome deriva da palavra grega *glykys*, que significa doce (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011; MENDES; SERRA, 2012). Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 4.

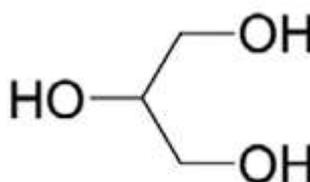


Figura 4 – Fórmula estrutural do glicerol.
Fonte: Beatriz; Araújo; Lima (2011).

A presença de três grupos hidroxila na molécula de glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica, suas moléculas são altamente flexíveis formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

O glicerol possui diversas aplicações na indústria química, de alimentos e terapêuticas, sendo ainda empregado como lubrificante na indústria têxtil, na produção de cápsulas, xaropes e pomadas, na elaboração de tintas, vernizes e detergentes, como conservante para balas, bolos e rações, entre outros (APOLINÁRIO; PEREIRA; FERREIRA, 2012; MARQUES et al., 2011).

Esta substância é empregada na formulação de filmes porque possui moléculas hidrofílicas relativamente pequenas que podem interagir facilmente com as cadeias do polímero, preenchendo os espaços “vazios”, aumentando a mobilidade molecular e a flexibilidade dos filmes (MALI et al., 2004).

O glicerol é um dos aditivos mais utilizados, e um dos mais efetivos se comparado a outros usados na formação de filmes. Comparando glicerol e sorbitol, o glicerol exerce plastificação mais efetiva, tornando os filmes mais hidrofílicos e flexíveis (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

3.7 TWEEN 80

O Tween 80, também conhecido como Polisorbato 80 de fórmula $C_{64}H_{124}O_{26}$, é um tensoativo hidrofílico, geralmente empregado para obter emulsões entre líquidos com polaridades opostas (MAPRIC, 2015).

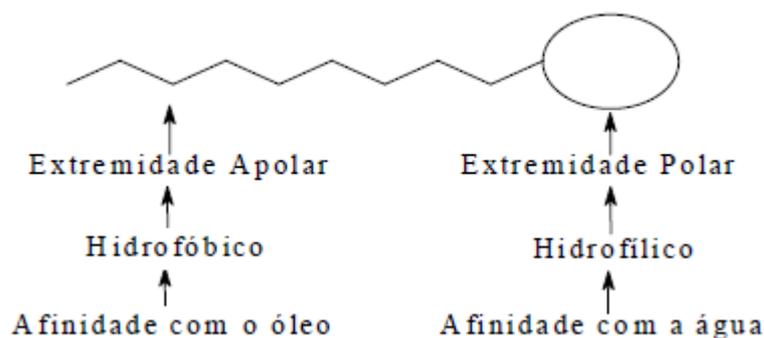


Figura 5 – Representação estrutural de um tensoativo.
Fonte: Rossi et al. (2006).

Os tensoativos são substâncias, usadas industrialmente, que possuem estruturas com duas polaridades distintas (Figura 5), uma polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica) que facilita sua interação tanto com substâncias polares quanto apolares, por este motivo o tween 80 é largamente utilizado como agente emulsificante e solubilizante (ROSSI et al., 2006).

Pelo fato dos tensoativos possuírem características parcialmente hidrofóbicas, alguns estudos utilizando estes agentes na elaboração de filmes biodegradáveis, tais como desenvolvidos por Ziani et al. (2008) e Rodríguez et al. (2006) vem sendo realizados na tentativa de diminuir a afinidade dos filmes pela água.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SORO DE LEITE

O concentrado protéico com 48% de proteína de soro de leite foi obtido por intermédio de um varejo comercial de venda de medicamentos e suplementos alimentares para atletas da cidade de Pato Branco.

4.2 ENSAIOS PRELIMINARES – Elaboração de biofilmes a base de soro de leite e avaliação do aspecto físico dos biofilmes

Para determinar a melhor concentração para a elaboração do biofilme, foram elaborados biofilmes contendo diferentes quantidades de soro (1,25, 2,50 e 5,00g) e empregando valores de pH 5,5 e 8,5 no processo. Foi determinada como melhor concentração de trabalho aquela em que o biofilme apresentou maior espessura e resistência ao rasgo.

Após definir a melhor concentração, adicionou-se glicerol para formação de um biofilme menos quebradiço e favorável ao manuseio.

4.3 ELABORAÇÃO DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE

Os biofilmes foram elaborados a partir da metodologia descrita por Gounga, Shi-Ying e Wang (2007), com algumas alterações. Para desnaturar as proteínas, o soro de leite foi disperso em 50 mL de água destilada e 0,5 mL de glicerol foi adicionado (totalizando 20% de glicerol em relação a quantidade de proteína presente em 5g de soro). O conjunto foi mantido sob agitação lenta em agitadores magnéticos com aquecimento a 90 °C por 30 minutos. A soluções filmogênicas

obtidas foram dispersas em placas de Petri e levadas a estufa com circulação de ar à 38 °C por cerca de 16 horas para evaporação do solvente. A Figura 6 ilustra o processo realizado.

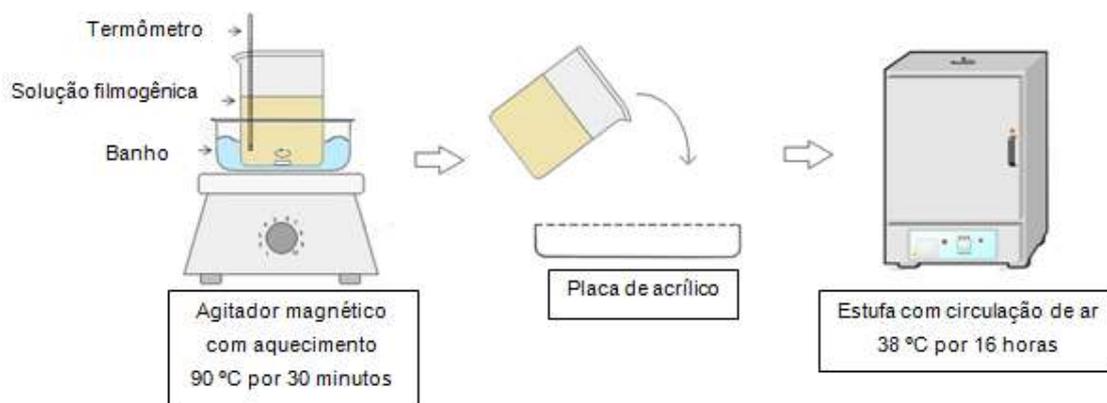


Figura 6 - Procedimento de elaboração dos biofilmes.
Fonte: Schllemer (2013).

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL 2²

Com o objetivo de avaliar a influência do pH e do agente surfactante, Tween 80, nas propriedades dos biofilmes, diferentes valores de pH e diferentes concentrações de Tween 80 foram empregados na elaboração dos biofilmes. Para tanto, na primeira etapa de produção, no momento de dissolução do soro, adicionou-se 0, 4.5 e 9.0% de Tween 80, representados na Tabela 1 pelos níveis codificados -1, 0 e 1, respectivamente. Hidróxido de sódio, 0,1 mol.L⁻¹ e ácido acético, 0,1 mol.L⁻¹, foram utilizados para alterar o pH das soluções para 5,5, 7 e 8,5, apresentados na Tabela 1 pelos níveis codificados -1, 0 e 1.

Tabela 1 - Valores reais e codificados para os fatores pH e concentração de Tween 80 utilizados no delineamento experimental para elaboração de biofilmes a base de soro de leite.

	Nível		
	-1	0	1
PH	5,5	7,0	8,5
Tween 80 (%)	0,0	4,5	9,0

A Tabela 2 apresenta a combinação desses níveis.

Tabela 2 – Matriz do planejamento fatorial 2² utilizado no delineamento experimental para elaboração de biofilmes a base de soro de leite.

Variáveis Independentes		
Experimento	pH	% Tween 80
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Foram realizadas cinco análises nos biofilmes produzidos, sendo elas: solubilidade em água, permeabilidade e transmissão ao vapor de água, tensão e alongação na ruptura dos filmes. Os resultados foram discutidos baseados no planejamento experimental 2² feito para cada análise mencionada.

4.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA

A determinação da solubilidade em água dos filmes foi determinada utilizando a metodologia descrita por Gounga, Shi-Ying e Wang (2007), com adaptações.

Os filmes foram recortados em quadrados de 2 cm x 2 cm e expostos ao aquecimento a 35 °C por 24 horas e posteriormente pesados, em seguida foram imersos em 25 mL de água destilada por 24 horas. Os filmes foram expostos novamente ao aquecimento para secagem a 35 °C por 24 horas para posterior pesagem. A porcentagem de solubilidade em água foi calculada através da Equação (1).

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

Onde: % M.S é o percentual de material solubilizado; m_i é a massa inicial de amostra e m_f é a massa final de amostra.

4.6 PROPRIEDADES DE BARREIRA A VAPORES DE ÁGUA

4.6.1 Permeabilidade e Transmissão a Vapores de Água

A determinação da permeabilidade ao vapor de água foi realizada seguindo o método ASTM E96 (ASTM, 1995), com adaptações. Os filmes foram acondicionados na extremidade superior de um recipiente contendo sílica previamente seca e o conjunto foi colocado em um dessecador ambientado por 24 horas com solução saturada de carbonato de potássio, provendo uma umidade relativa, (UR), de 43%.

Os filmes ficaram expostos a duas pressões diferentes, no qual a parte inferior do filme ficou exposta a uma UR=0 %, (interior do recipiente). A parte superior do filme ficou exposta ao ambiente do dessecador, UR=43 %.

O conjunto (filme + sílica) foi pesado antes da exposição à UR 43%, e durante 5 horas de exposição, foram pesados regularmente.

A taxa de transmissão de vapores de água (TVA) foi calculada a partir da Equação (2).

$$TVA = \frac{\Delta w}{\Delta t} \times A \text{ (} gm^{-2}s^{-1}\text{)} \quad (2)$$

Onde $\frac{\Delta w}{\Delta t}$ é a quantidade de umidade adquirida pela sílica por unidade de tempo ($g \cdot s^{-1}$), e A é a área exposta do filme em m^2 .

A permeabilidade aos vapores de água foi calculada através da Equação (3).

$$PVA = \frac{TVA \times l}{p_1 - p_2} \quad (gm^{-1}s^{-1}Pa^{-1}) \quad (3)$$

Onde $p_1 - p_2$ é a diferença das pressões exercidas sobre o filme (Pa) e l é a espessura do filme em metros.

O esquema representado na Figura 7 exemplifica o procedimento adotado nesta análise.

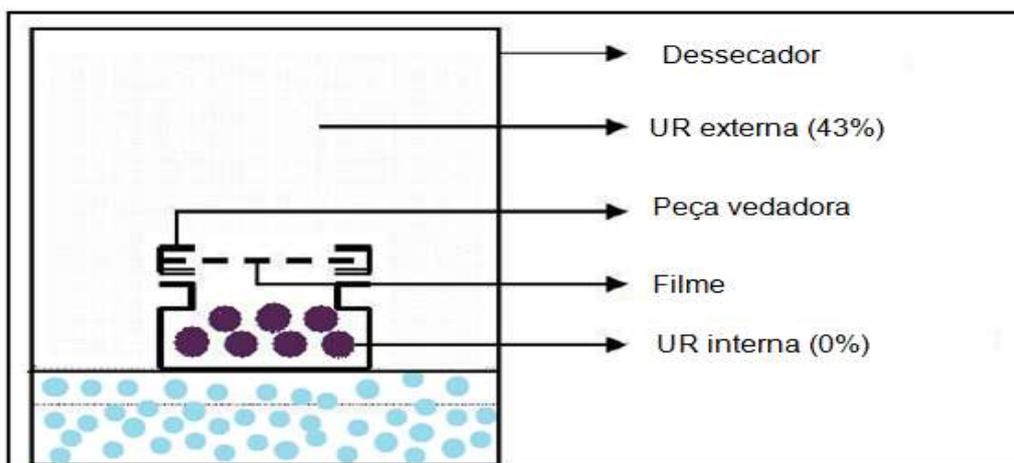


Figura 7 – Célula utilizada na análise das propriedades de barreira a vapores de água dos biofilmes a base de soro de leite.
Fonte: Adaptado de Marques (2005).

4.7 PROPRIEDADES MECÂNICAS

4.7.1 Elongação e Resistência à Tração na Ruptura

Os ensaios de tensão e alongação na ruptura dos filmes foram realizados usando um Texturômetro TA.XT Plus da Stable Micro System, operando de acordo com o método ASTM D 882-02 (ASTM 2002), com adaptações. A separação inicial das garras foi de 30 mm e a célula de carga utilizada foi de 50N. A velocidade de

separação das garras foi de $0,21 \text{ mms}^{-1}$, conforme sugerido por Soares (2012) para filmes de proteínas de soro de leite. Os filmes foram recortados em retângulos de 2 cm de largura por 5 cm de comprimento, a fim de fixá-los nas garras do equipamento e suas espessuras foram medidas utilizando um micrômetro digital, Eletronic Autside Micrometer mod. 3109-50, para tanto utilizou-se a média de cinco medidas de pontos diferentes dos filmes.

A tensão, isto é, a resistência à tração na ruptura foi calculada a partir da Equação (4).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4)$$

Onde σ é a tensão na ruptura (Pa), F é a força (N) na ruptura e A é a área de seção transversal (m^2).

A porcentagem de alongação foi calculada a partir da Equação (5).

$$\% \text{ alongação na ruptura} = \frac{\text{extensão do filme na ruptura (m)}}{\text{distância inicial de separação entre as garras (m)}} \times 100 \quad (5)$$

4.8 MICROSCOPIA

As fotos obtidas foram registradas em um microscópio óptico de bancada modelo BX41, localizado no laboratório de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná -UTFPR, campus Pato Branco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES – Elaboração de biofilmes a base de soro de leite e avaliação do aspecto físico dos biofilmes

Conforme pode ser observado na Figura 8, todos os filmes, indiferente da concentração de soro, apresentaram-se amarelados e quebradiços em ambos os pHs.

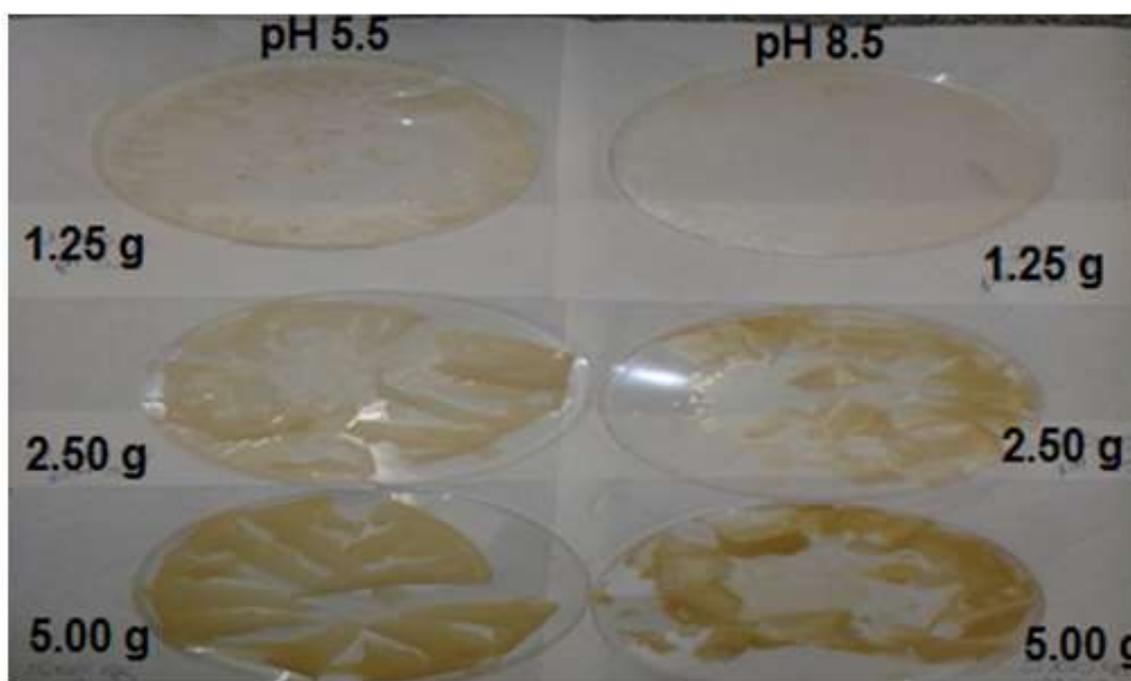


Figura 8 - Biofilmes com 1,25, 2,50 e 5,00 gramas de soro de leite nos pHs 5,5 e 8,5
Fonte: Autoria própria.

A Tabela 3 apresenta os resultados qualitativos desta análise.

Tabela 3 - Resultados dos ensaios preliminares para a elaboração de biofilmes a base de soro de leite.

Quantidade de Soro (g)	Espessura	Resistência ao Rasgo
1,25	Menor	Menor
2,50	Média	Média
5,00	Maior	Maior

Os filmes contendo 1,25 gramas de soro apresentaram espessura fina, aderindo-se a superfície da placa de Petri. Na tentativa de retirar estes filmes das placas, os mesmos quebravam-se mais ainda, dificultando o manuseio. Os filmes contendo 2,50 gramas de soro apresentaram espessura e resistência ao rasgo média, o que não é ideal, pois é necessário que os filmes possuam espessura e resistência ao rasgo maior, visto que ao adicionar o glicerol os filmes tornam-se flexíveis e susceptíveis a deformação mecânica. Portanto, o filme com 5 gramas de soro de leite foi escolhido para os posteriores testes, por apresentar melhores características para o manuseio. A Figura 9 apresenta o filme após adição do glicerol.

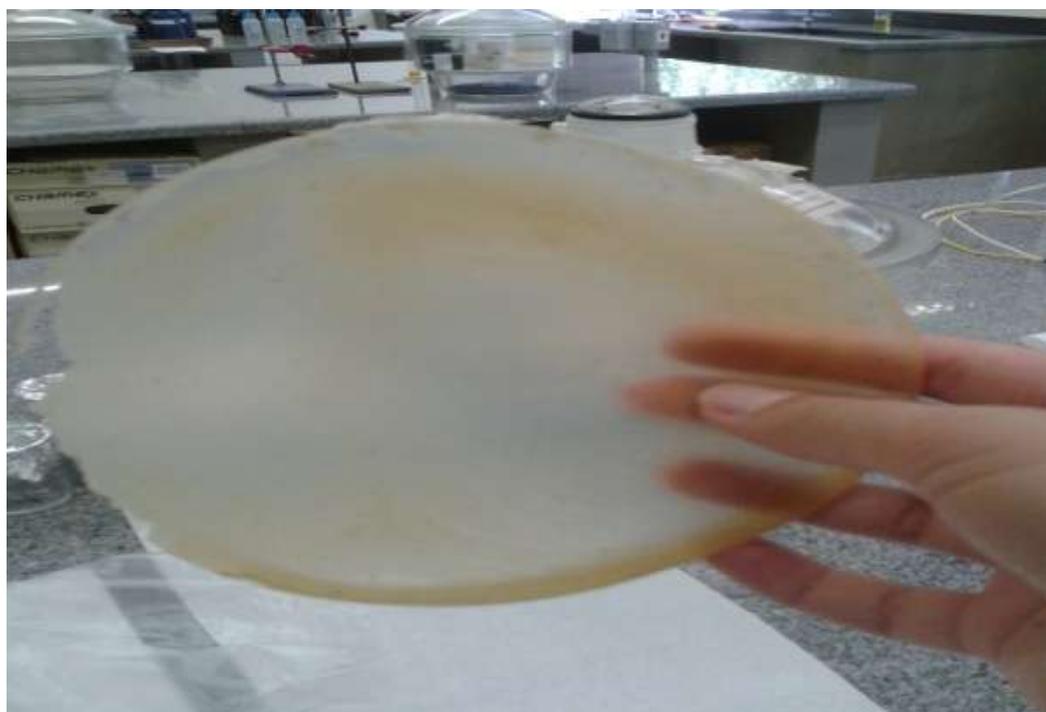


Figura 9 - Biofilme com 5 gramas de soro de leite e 20% de glicerol
Fonte: Autoria própria.

Obteve-se um filme inteiro, compacto e fácil de ser manuseado após adição do glicerol. As moléculas do plastificante, por serem pequenas e possuir polaridade favorável formam ligações com a proteína, preenchendo os espaços vazios que antes favoreciam a ruptura dos filmes (MALI *et al.*, 2004).

5.2 SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Verifica-se através do planejamento experimental 2², apresentado na Tabela 4, que todos os filmes, independente da variação de pH e concentração de Tween 80, apresentaram baixas porcentagens de solubilização. Este resultado está de acordo com resultados obtidos por Pérez-Gago, Nadaud e Krochta (1999), no qual filmes de proteína de soro de leite formulados com pHs 4, 5, 6, 7 e 8 mantiveram sua integridade, com solubilidade muito próxima a zero, após 24 horas de contato com a água. Os autores explicam que a destruição da estrutura tridimensional das proteínas provocada pela desnaturação térmica, expõe os grupos SH que ficam "escondidos" no interior da molécula, permitindo a formação de ligações de dissulfeto intermoleculares.

Tabela 4 - Resultados do planejamento experimental 2² para o teste de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.

Experimento	pH Níveis Codificados	pH Valores Reais	Tween 80 (%) Níveis Codificados	Tween 80 (%) Valores Reais	Resposta Solubilidade (%)
1	-1	5,5	-1	0,0	0,08
2	+1	8,5	-1	0,0	0,03
3	-1	5,5	+1	9,0	0,07
4	+1	8,5	+1	9,0	0,06
5	0	7,0	0	4,5	0,06
6	0	7,0	0	4,5	0,06
7	0	7,0	0	4,5	0,07

Analisando as respostas na Tabela 4, verifica-se que o experimento 2, resultante da combinação pH 8,5, e ausência de Tween 80, apresentou a menor porcentagem de solubilização.

Para explicar este resultado, os dados acima foram submetidos a uma análise estatística pelo teste t, no qual verifica-se como cada variável influenciou na resposta. A Tabela 5 apresenta os resultados desta análise.

Tabela 5 - Análise da influência do pH e Tween 80 na solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t_{cal}	p	Limite Inferior	Limite Superior
Média	0,061429	0,002020	30,40559	0,000078	0,054999	0,067858
pH	-0,030000	0,005345	-5,61249	0,011181	-0,047011	-0,012989
Tween 80	0,010000	0,005345	1,87083	0,158124	-0,007011	0,027011
pH x Tween 80	0,020000	0,005345	3,74166	0,033307	0,002989	0,037011

Na Tabela 5, o módulo de $t_{calculado}$ para o pH, e para a interação pH x Tween 80 foi maior que o $t_{teórico}$ (2,4469) ao nível de confiança de 95%; portanto, apenas o pH e a interação pH x Tween 80 influenciaram no processo. Este resultado indica que o Tween 80 somente influencia na solubilidade devido aos diferentes tipos de interação com o pH.

O Gráfico de Pareto, Figura 10, ilustra o efeito das variáveis independentes sobre a variável dependente, solubilidade dos biofilmes. Observa-se que quanto maior o valor do $t_{calculado}$, maior é o efeito e a distância da coluna, este efeito é significativo quando a coluna extrapola a linha vertical vermelha.

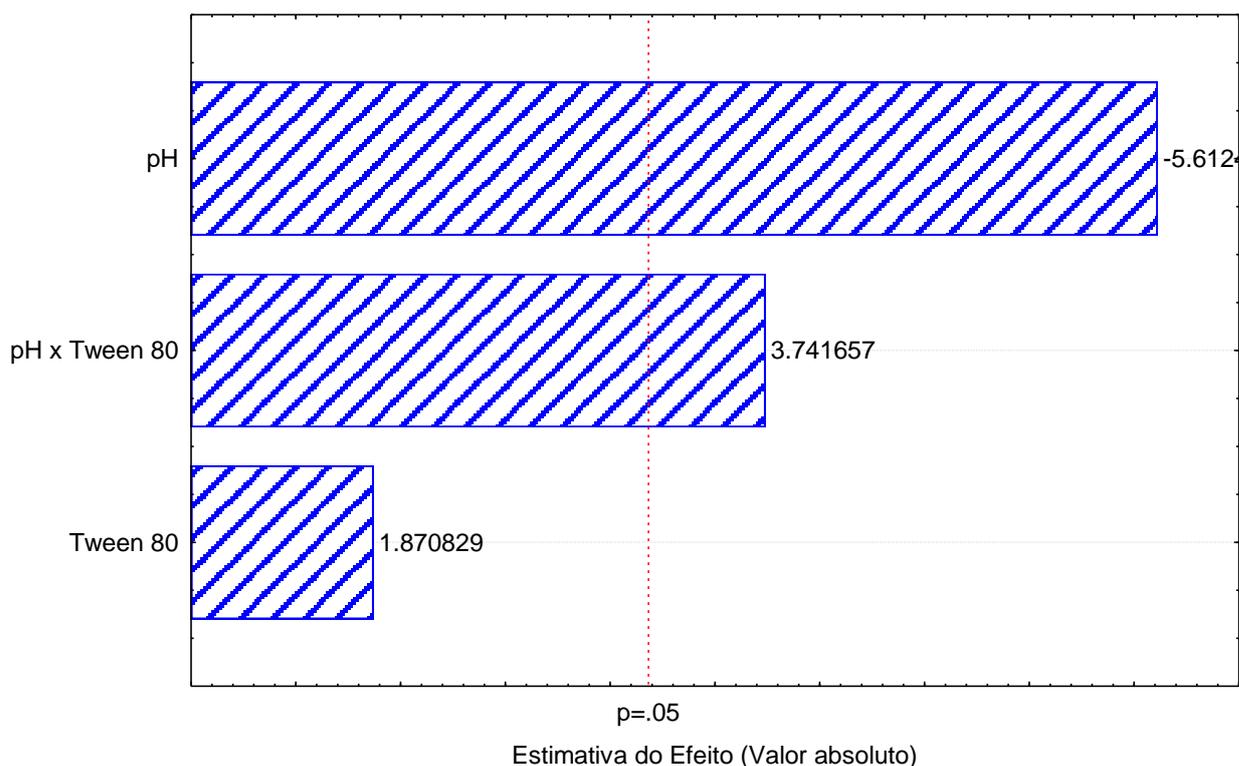


Figura 10 - Gráfico de Pareto para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.

Através das micrografias apresentadas na Figura 11, foi possível verificar visivelmente o efeito dessa interação entre o pH e o Tween 80. No filme formado com pH 5,5, Figura 11a, é possível observar a presença de manchas claras e escuras espalhadas pelo filme.

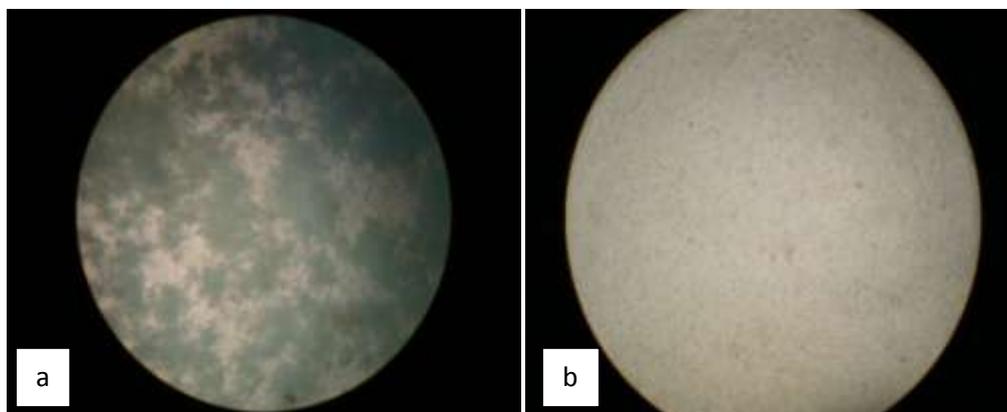


Figura 11 - Micrografias ópticas de biofilmes a base de soro de leite contendo 9 % de Tween 80 em pH 5,5 (a) e pH 8,5 (b)
Fonte - Autoria própria.

Acredita-se que estas manchas estejam relacionadas a separação de fase entre Tween 80, água e proteína, fenômeno este provocado pelo meio ácido, que pode ter promovido a diminuição de sítios ativos que participariam da interação Tween 80 x proteína. Para os filmes formados a pH 8,5, figura 11b, não se observou diferenças de coloração. Acredita-se que a interação foi favorecida pelo meio básico, formando um biofilme, a nível microscópico, homogêneo e sem fases.

Para avaliar o ajuste do modelo estatístico ao tipo de análise empregada, um gráfico de valores observados e preditos foi elaborado e está apresentado na Figura 12.

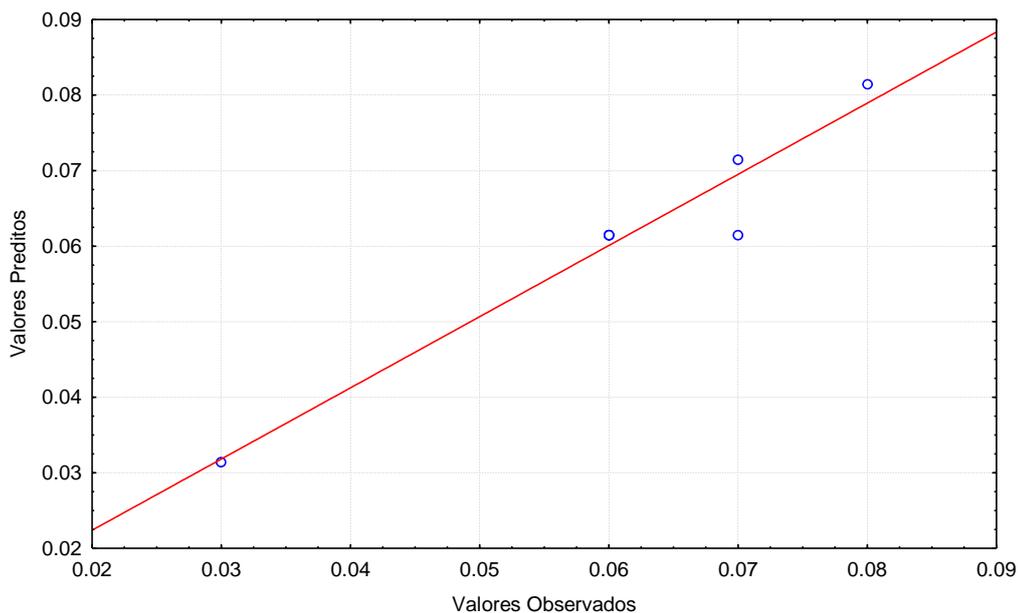


Figura 12 - Gráfico de valores preditos e observados para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.

A reta obtida na Figura 12 apresenta, coeficiente de correlação, R^2 , igual a 0,942, isto indica que a relação entre pH, Tween 80 e solubilidade é linear, e que a equação que rege a variação da solubilidade dos filmes em função do pH e da concentração de Tween 80 é de primeira ordem, Equação 7.

$$\text{Solubilidade (\%)} = 0,061 - 0,015x + 0,005y + 0,01xy \quad (7)$$

Através da Equação 7, onde x é o valor do pH e y a porcentagem de Tween 80, pode-se prever a solubilidade dos filmes em outros ensaios com diferentes valores de pH e Tween 80.

O comportamento da solubilidade frente a interação pH e Tween 80 é ilustrado no gráfico de superfície de resposta, apresentado em 3D na Figura 13, e em 2D na Figura 14.

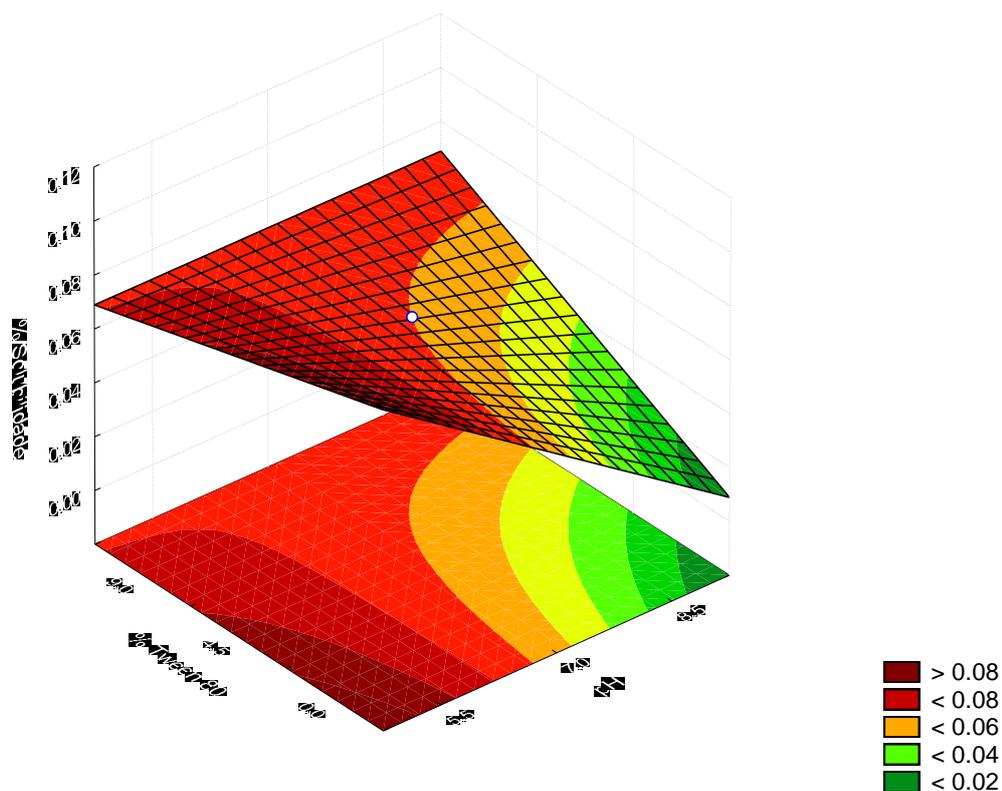


Figura 13 - Gráfico de superfície de resposta em 3D para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.

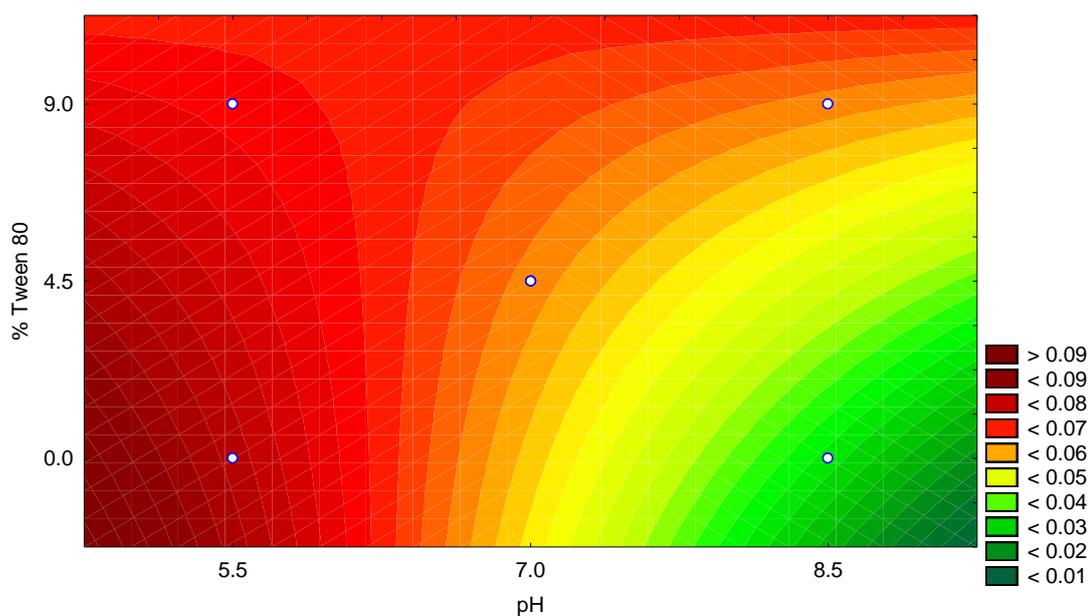


Figura 14 - Gráfico de superfície de resposta em 2D para o ensaio de solubilidade dos biofilmes a base de soro de leite.

Verifica-se que a solubilidade tende a diminuir em pHs mais altos e na ausência de Tween 80, este ponto pode ser visualizado no campo esverdeado da

Figura 14. Acredita-se que a solubilidade foi menor para os biofilmes com pH 8,5, devido a maior homogeneidade dos mesmos, fato este evidenciado pela ausência de manchas e partículas não dissolvidas na superfície dos mesmos, conforme visto na micrografia óptica (Figura 11b).

Ao analisar a extremidade direita da Figura 14, observa-se que a adição do Tween 80 aumentou a solubilidade dos biofilmes com pH 8,5. Resultado semelhante foi encontrado por Rodríguez et al (2006), seus estudos revelaram que o Tween 20 (outro agente tensoativo estudado na elaboração de biofilmes), quando utilizado em altos teores, na presença do plastificante glicerol, comporta-se como agente plastificante, aumentando a hidrofiliabilidade dos biofilmes.

5.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS

5.3.1 Elongação e resistência à tração na ruptura

Observa-se através dos resultados do planejamento experimental apresentados na Tabela 6, que o experimento 2, que é uma combinação do pH 8,5 e ausência de Tween 80, apresentou a maior porcentagem de alongação, 30,64%, e a maior resistência à tração, 1,28 MPa.

Tabela 6 - Resultados do planejamento experimental 2² para os testes mecânicos nos biofilmes a base de soro de leite.

Experimento	pH Níveis Codificados	PH Valores Reais	Tween 80 (%) Níveis Codificados	Tween 80 (%) Valores Reais	Respostas	
					Elongação (%)	Resistência (MPa)
1	-1	5,5	-1	0,0	13,18	0,43
2	1	8,5	-1	0,0	30,64	1,28
3	-1	5,5	1	9,0	6,26	0,38
4	1	8,5	1	9,0	29,28	0,83
5	0	7,0	0	4,5	6,49	0,32
6	0	7,0	0	4,5	6,68	0,36
7	0	7,0	0	4,5	6,59	0,40

Para discutir os resultados da Tabela 6, a influência significativa de cada variável nos ensaios de alongação e resistência à tração foi avaliada. Os resultados desta análise estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Análise da influência do pH e Tween 80 na elongação dos biofilmes a base de soro de leite.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t_{cal}	p	Limite Inferior	Limite Superior
Média	16,22455	2,257738	7,186195	0,00018	10,8858	21,56325
pH	20,2375	5,294865	3,822099	0,006524	7,7171	32,75787
Tween 80	-4,1475	5,294865	-0,783306	0,459125	-16,6679	8,37287
pH x Tween 80	2,7825	5,294865	0,525509	0,615459	-9,7379	15,30287

Tabela 8 - Análise da influência do pH e Tween 80 na resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t_{cal}	p	Limite Inferior	Limite Superior
Média	0,626364	0,063718	9,83027	0,000024	0,475695	0,777032
pH	0,6475	0,149432	4,33309	0,003425	0,294151	1,000849
Tween 80	-0,2525	0,149432	-1,68974	0,134926	-0,605849	0,100849
pH x Tween 80	-0,1975	0,149432	-1,32168	0,227832	-0,550849	0,155849

Observa-se que tanto para a elongação quanto para a resistência à tração apenas o pH apresentou t calculado (módulo) maior que o t teórico, ao nível de 95% de confiança. Isto indica que o pH foi a única variável que influenciou significativamente nos processos, as Figuras 15 e 16 ilustram os efeitos das variáveis para o ensaio de elongação e resistência à ruptura.

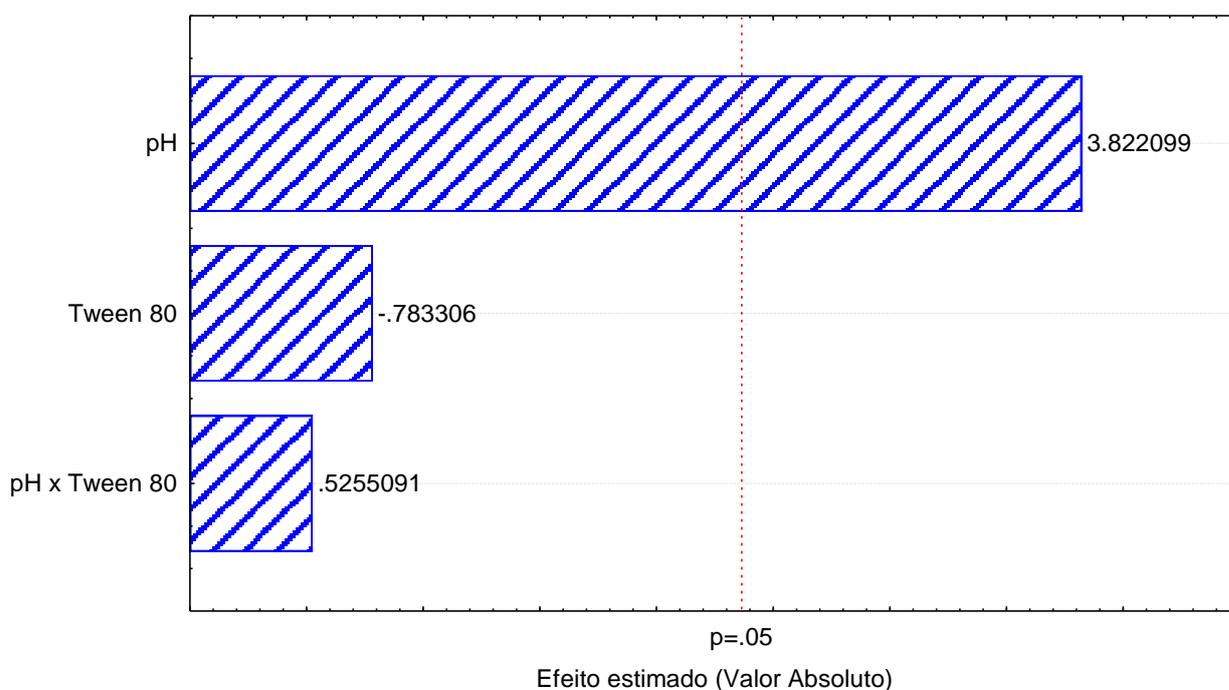


Figura 15 - Gráfico de Pareto para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite

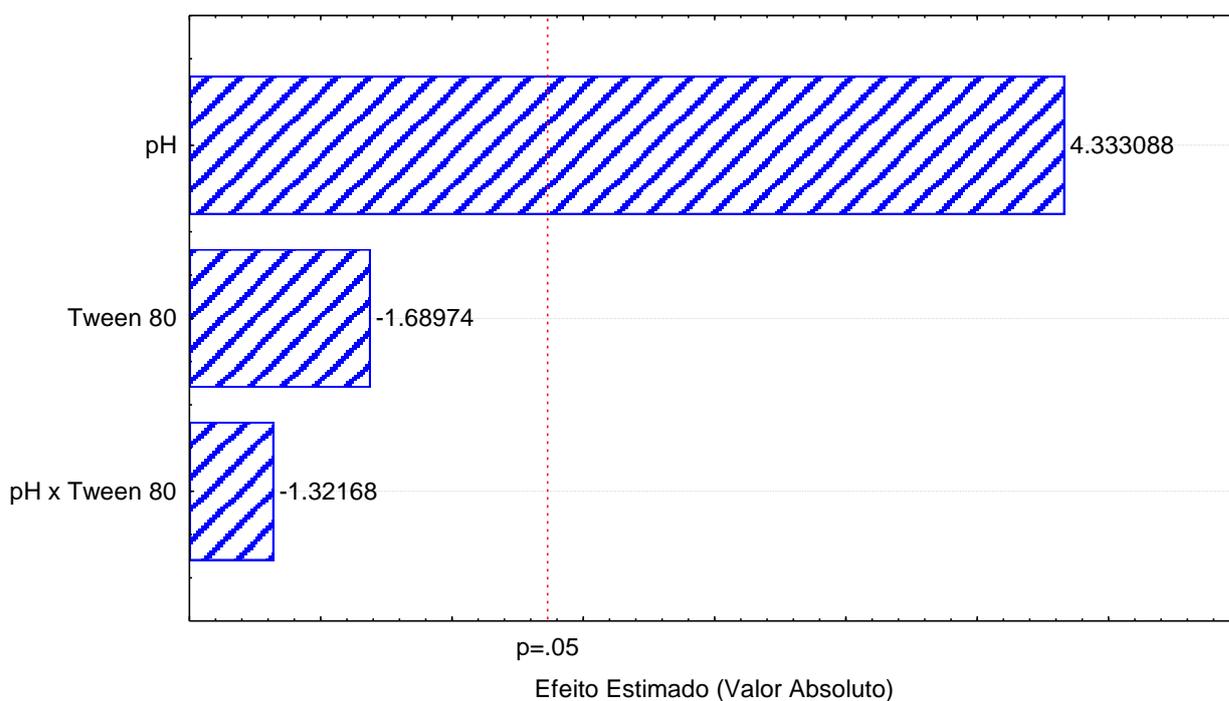


Figura 16 - Gráfico de Pareto para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite.

O pH influenciou significativamente nos processos e isto deve estar relacionado ao fato dos filmes apresentarem texturas bem distintas em diferentes valores de pHs de formulação. Os filmes com pH 5,5, Figura 17a e b, podem ter

apresentado baixa porcentagem de alongação e resistência à tração devido ao fato de apresentarem vários conjuntos de partículas não dissolvidas distribuídas ao longo de suas superfícies. Os filmes formulados a pH 7,0, Figura 17c, também apresentaram porcentagem de alongação e resistência à tração baixa, as partes mais claras apresentadas na Figura 17c são as falhas formadas durante o processo de secagem. A presença dessas falhas ao longo da superfície, diminuiu a interação entre as moléculas do filme, tornando fácil o rompimento. Os filmes com pH 8,5, Figura 17d e 17e, foram os únicos que apresentaram textura homogênea, e também maior porcentagem de alongação e resistência à ruptura .

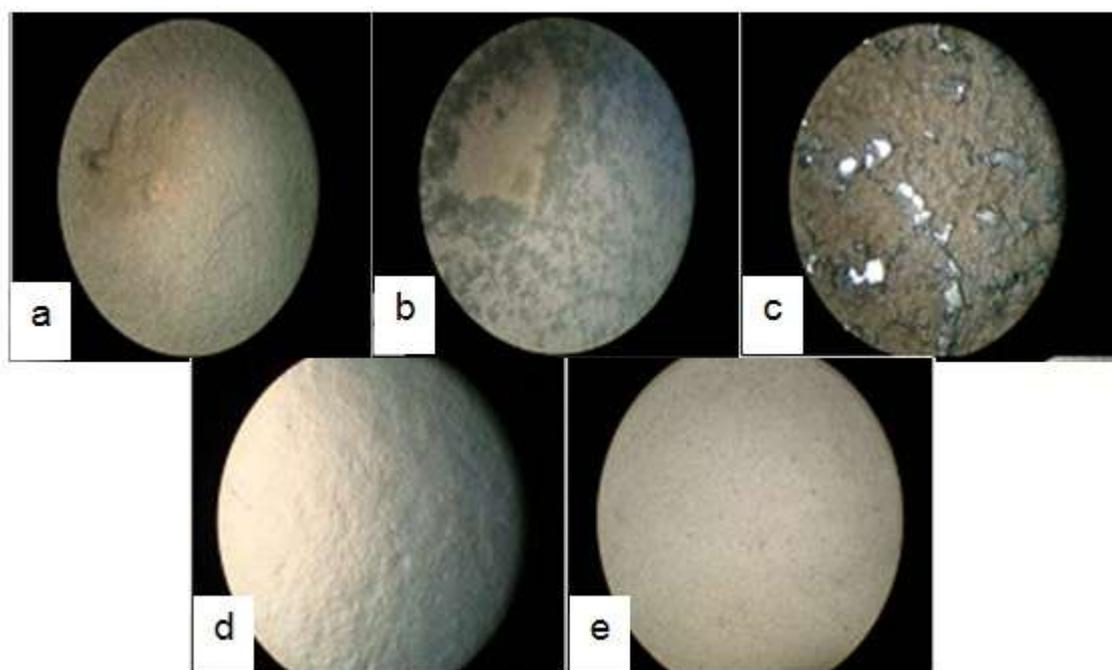


Figura 17 - Biofilme com pH 5,5 sem Tween 80 (a), pH 5,5 com Tween 80 (b) pH 7,0 com Tween 80 (c), pH 8,5 sem Tween 80 (d) pH 8,5 com Tween 80 (e)

Fonte: Autoria própria.

Os gráficos dos valores preditos e observados para a porcentagem de alongação e resistência à ruptura dos filmes estão apresentados nas Figuras 18 e 19.

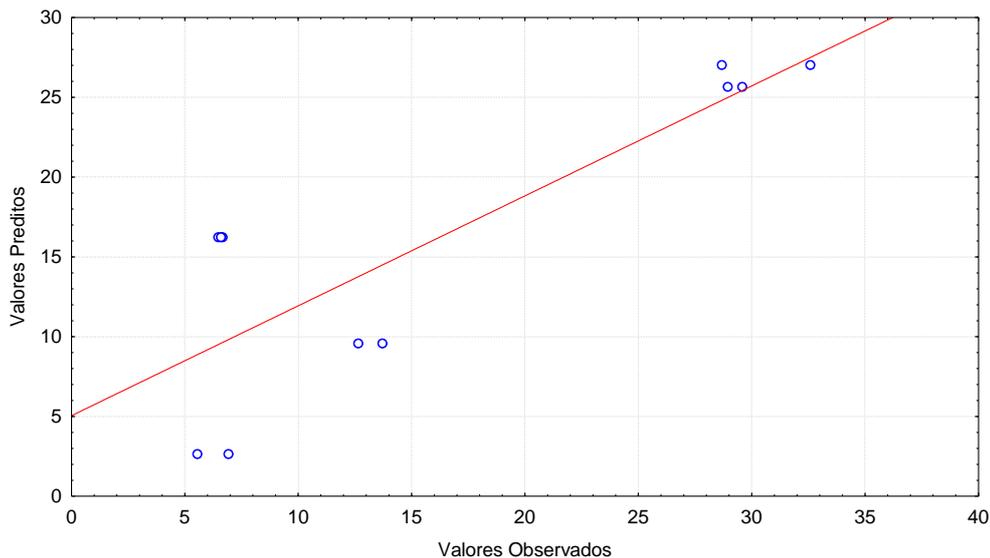


Figura 18 - Gráfico de valores preditos e observados para o ensaio de alongação nos biofilmes a base de soro de leite.

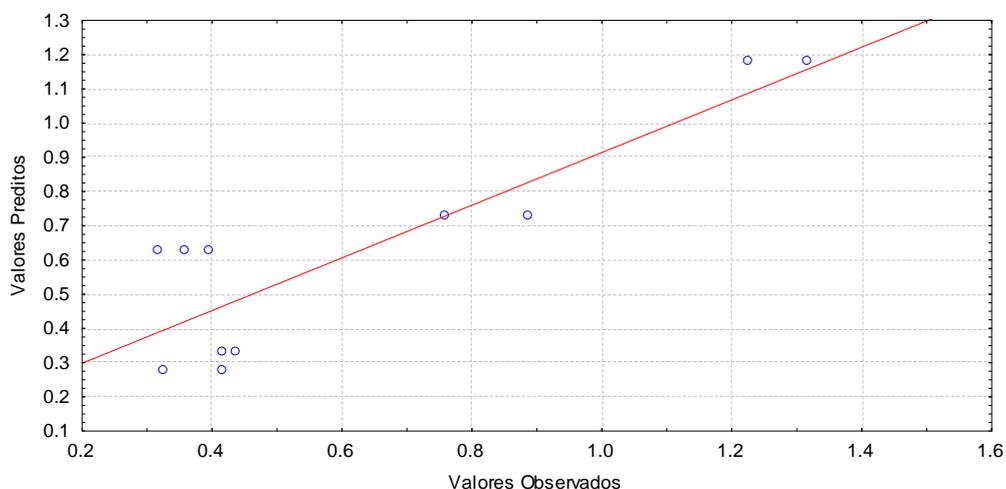


Figura 19 - Gráfico de valores preditos e observados para o ensaio de resistência à tração nos biofilmes a base de soro de leite.

O coeficiente de correlação, R^2 , da Figura 18 foi de 0,69 e da Figura 19 foi de 0,77. Isto significa que apenas 69% dos resultados do ensaio de alongação e 77% da variabilidade dos dados de resistência podem ser explicadas pelos modelos multivariados propostos. Utilizando as Equações (8) e (9) tem-se a alongação e a resistência dos biofilmes em qualquer concentração de Tween 80 e valor de pH, onde x é o valor do pH e y a porcentagem de Tween 80.

$$\text{Alongação (\%)} = 16,224 + 10,118x - 2,074y + 1,391xy \quad (8)$$

$$\text{Resistência à Ruptura (MPa)} = 0,626 + 0,324x - 0,126y - 0,099xy \quad (9)$$

Os gráficos de superfície de resposta em 3D e em 2D para a porcentagem de alongação dos biofilmes encontram-se nas Figuras 20 e 21.

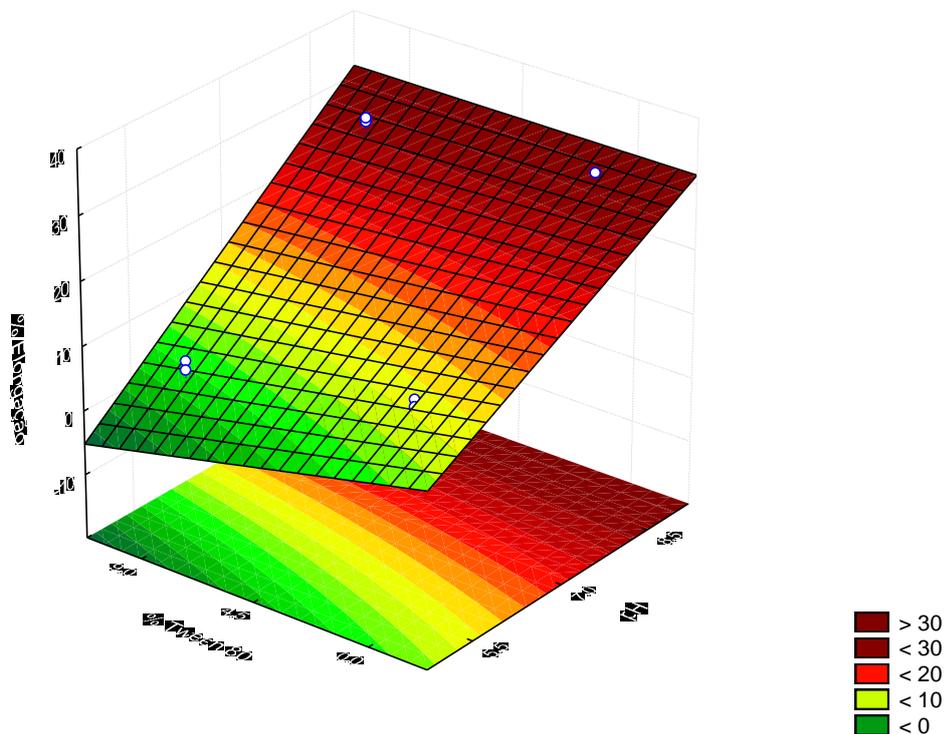


Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta em 3D para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite.

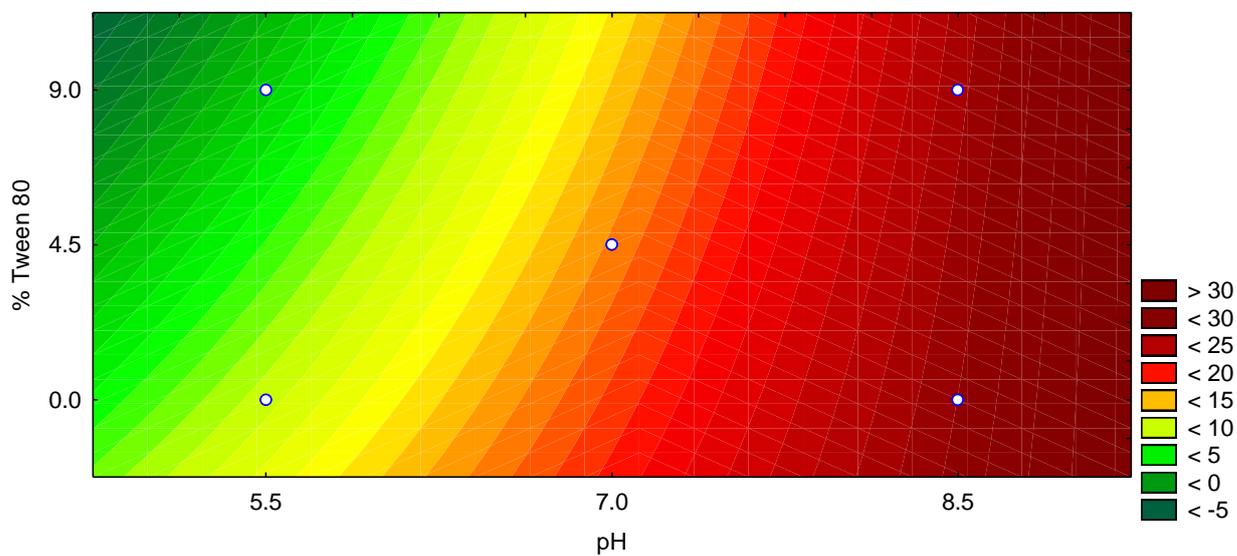


Figura 21 - Gráfico de superfície de resposta em 2D para o ensaio de alongação dos biofilmes a base de soro de leite.

Conforme pode ser observado na Figura 21, a porcentagem de alongação dos biofilmes de fato aumentou com o aumento do pH, independente da concentração de Tween 80. Este resultado está de acordo com a análise de efeitos, na qual apenas o pH influenciou significativamente no processo.

Os gráficos de superfície de resposta em 3D e em 2D para a resistência à tração encontram-se nas Figuras 22 e 23.

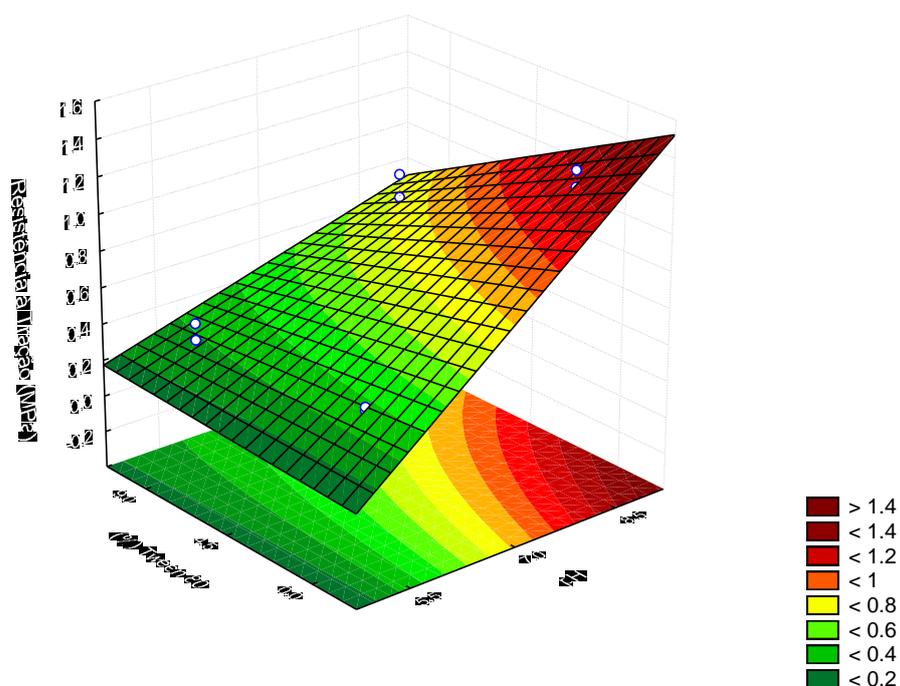


Figura 22 - Gráfico de superfície de resposta em 3D para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite.

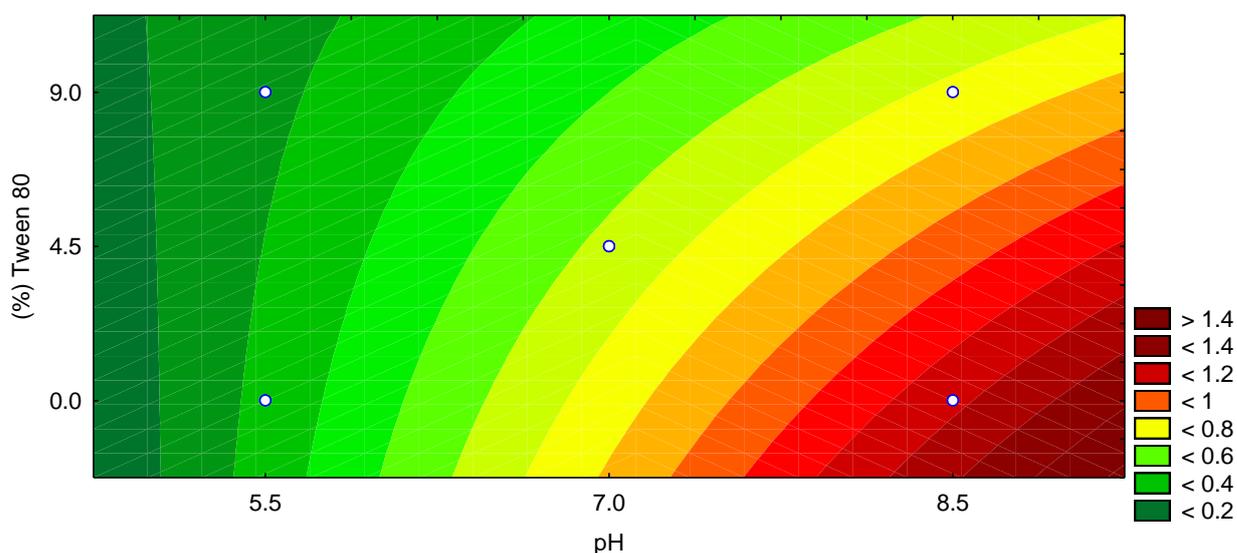


Figura 23 - Gráfico de superfície de resposta em 2D para o ensaio de resistência à tração dos biofilmes a base de soro de leite.

Observa-se na Figura 23 que a resistência dos biofilmes à ruptura aumentou conforme aumentou o pH e que os valores maiores de Tween 80 associados ao pH 8,5, linhas avermelhadas das Figura 23, produziram filmes menos resistentes. Acredita-se que mais uma vez o Tween 80 atuou em conjunto com o glicerol, visto que um agente plastificante em certas condições pode desempenhar funções antiplastificante, diminuindo a flexibilidade dos mesmos (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

5.4 PROPRIEDADES DE BARREIRA

5.4.1 Permeabilidade e transmissão a vapores de água

Não foi possível obter resultados deste ensaio, pois os filmes formulados no pH 8,5 apresentaram espessura fina, tornando-se muito frágeis, ao serem colocados na célula de análise, rompiam-se facilmente. Não se prosseguiu com os ensaios, pois estas rachaduras atuam como "brechas" por onde o ar pode passar e atingir a sílica sem ter de fato permeado o filme. Outro fato importante são as falhas apresentadas nos filmes formulados no pH 7,0 que também possibilitam a passagem direta do ar.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados revelam que os biofilmes de proteína de soro de leite apresentam características relevantes para possível produção de plásticos biodegradáveis. Embora as propriedades mecânicas necessitem ser melhoradas, os filmes mantêm sua integridade mesmo após 24 horas de imersão em água destilada.

Os biofilmes contendo 5 gramas de soro de leite apesar de apresentarem-se quebradiços, são os que apresentam melhores características ao manuseio. Destaca-se neste contexto que foi possível realizar os ensaios mecânicos destes biofilmes devido a presença de glicerol que formou uma matriz contínua possível de ser trabalhada.

A adição de Tween 80 não contribui significativamente na solubilidade e nas propriedades mecânicas dos biofilmes. O pH exerce influência significativa, pois verificou-se que a solubilidade é menor e a porcentagem de alongação e a resistência à tração são maiores para biofilmes formulados no pH 8,5.

Destaca-se também a importância da utilização da análise quimiométrica no desenvolvimento de novos materiais, tal como a possibilidade de redução do número de experimentos, poupando tempo e matéria-prima, ao mesmo tempo em que se mantém o nível de confiança dos resultados.

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Luiza C de et al. O apelo sedutor das embalagens uma estratégia de marketing. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, ILCT/EPAMIG**. n. 289, v, 49, p. 3 - 11, 1994.

AMDA. **Ciclo de vida do saco plástico**. Associação Mineira de Defesa do Ambiente. 2015. Disponível em:<<http://www.amda.org.br/?string=interna-projetos&cod=27>>. Acesso em: 14 mai. 2015.

APOLINÁRIO, Fagner D. B.; PEREIRA, Gilliaster de F ; FERREIRA , Jonathan P. Biodiesel e Alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**. v. 2, n. 1, p. 141-146, 2012.

ASTM. **Standard Test Methods for water vapor transmission of materials**. Designation E96: American Society for Testing and Materials, 1995.

ASTM. **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. Designation D 882: American Society for Testing and Materials, 2002.

AZEVEDO, Viviane M. et al. Propriedades de barreira, mecânicas e ópticas de filmes de concentrado proteico de soro de leite. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 4, p. 237-247, 2014.

BARDI, M.A.G.; ROSA, D.S. Avaliação da biodegradação em solo simulado de poli (ϵ -caprolactona), acetato de celulose e suas blends. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 26, n. 1, p. 43-47, 2007.

BEATRIZ, Adilson; ARAÚJO, Yara J. K.; LIMA, Dênis P. de. glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BOURTOOM, T. Review Article: Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, v.15, n. 3, p. 237-248. 2008.

CAMPBELL, Mary K.; FARRELL, Shawn O. **Bioquímica básica**. São Paulo: Cengage Learning Edições, 2011.

CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A.; FERRIER, Denise R. **Bioquímica ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

CETESB. Alterações físico-químicas. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_materia.php>. Acesso em: 14 mai. 2015.

DIAS, Amanda B. et al. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**. v. 5, p. 213–219, 2010.

GHASEMLOU, Mehran et al. Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. **Carbohydrate Polymers**. v. 98, p. 1117– 1126, 2013.

GIROTO, J.M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**. n. 10, 2001.

GOUNGA, Mahamadou E.; SHI -YING, Xu; WANG, Zhang. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**. v. 83, p. 521–530, 2007.

HENRIQUE, Celina M.; CEREDA Marney P.; SARMENTO, Silene B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 231-240, jan./mar. 2008.

KOOLMAN, Jan. **Bioquímica: texto e atlas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005.

LECETA, I. et al. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **European Polymer Journal**, v. 66, p.170–179, 2015.

LUCHESE, Claudia L. et al. Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 203 - 210, 2015.

MACHADO, Rosângela M. G.; SILVA, Patrícia C. da; FREIRE, Valdir H. Controle ambiental em indústrias de laticínios. **Brasil Alimentos**. n. 7, 2001.

MALI, Suzana et al. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**. n. 56, p. 129–135, 2004.

MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria V. E.; YAMASHITA, Fábio. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, jan./mar. 2010.

MAPRIC. Boletim Técnico Tween 80. São Paulo, SP. Disponível em:< <http://www.mapric.com.br/produtos.php?mapric=ver&codigo=544>>. Acesso em 14 mai. 2015.

MARQUES, P. T. **Propriedades Térmicas, Mecânicas e Reológicas de Filmes de amido de Mandioca: Efeito da adição de Plastificante e Agentes Reticulantes**. 2005. 138f. Tese (Doutorado em Físico Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

MARQUES, Edmar P. et al. Metodologia analítica para glicerol em biodiesel: cenário atual. **Cad. Pesq., São Luís**, v. 18, n. especial, 2011.

MARZOCCO, Anita; TORRES, Bayardo B. **Bioquímica Básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999.

MENDES, Danylo B.; SERRA, Juan C. V. Glicerina: uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p. 01-XX, 2012.

MOTTA, Valter T. **Bioquímica básica**. Laboratório AutoLab Ltda, 2015.

MURRAY, Roberto K.; GRANNER, Daryl K.; RODWELL, Victor W. **Bioquímica ilustrada**. 7. ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana Editores, 2007.

NEGRÃO, Celso; CAMARGO, Eleida. **Design de embalagem: do marketing á produção**. São Paulo: Novatec Editora, 2008.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Worth Publishers, 2002.

QUINTERO, Ednelí S. M.; SOBRAL, PAULO J. do A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nylo para elaboração de biofilmes. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.35, n.1, p.179-189, jan. 2000.

PAULA, Junio C. J. de; CARVALHO, Antônio F. de; FURTADO, Mauro M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**. v. 64, n. 367/368, p. 19-25, 2009.

PELEGRINE, Daniela H.; GASPARETTO, Carlos A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.1, p.57-65, 2003.

PÉREZ-GAGO, M.B.; NADAUD, P.; KROCHTA J.M. Water Vapor Permeability, Solubility, and Tensile Properties of Heat-denatured versus Native Whey Protein Films. **Journal of Food Science**. v. 64, n. 6, 1999.

PETERSEN, Karina et al. Potential of biobased materials for food packaging. **Trends in Food Science & Technology**. p. 52 - 68. 1999.

RODRÍGUEZ, Maria et al. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**. n. 39, p 840–846, 2006.

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

ROSSI , Cátia G. F. T et al. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Rev. Univ. Rural**. v. 25, n.1- 2, p. 59-71, 2006.

SCHLLEMER, Magalí A. **Preparação e caracterização de biofilmes à base de manipueira para imobilização de caulinita intercalada com ureia**. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

SHIMAZU, Angélica A.; MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

SILVA, Washington A. da et al. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 154-163, 2007.

SILVA, Danilo G. da; LEITE, Vítor de C. A importância da embalagem como vantagem logística: um estudo de caso. **Tékhnē e Lógos**, Botucatu, v.1, n.3, 2010.

SOARES, Dayana S. B. **Influencia do pH e da irradiação em filmes biodegradáveis de proteínas do soro de leite**. 2012. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

THARANATHAN. R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**. v. 14, p. 71–78, 2003.

WIT, J. N. de. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 3, 1998.

YOSHIDA, Cristiana M. P.; ANTUNES, Aloísio J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n. 29, v. 2, p. 420-430, 2009.

ZIANI, Khalid et al. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **Food Science and Technology**. n. 4, p. 2159-2165, 2008.