



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Laís Ravazzi Amado

Filmes à base de proteína isolada de soja e alginato de sódio – Aspectos das misturas de biopolímeros, propriedades dos filmes e efeitos de extrato de beldroega nos filmes

São José do Rio Preto
2022

Laís Ravazzi Amado

Filmes à base de proteína isolada de soja e alginato de sódio – Aspectos das misturas de biopolímeros, propriedades dos filmes e efeitos de extrato de beldroega nos filmes

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mauro
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Keila de Souza Silva

São José do Rio Preto
2022

Laís Ravazzi Amado

Filmes à base de proteína isolada de soja e alginato de sódio – Aspectos das misturas de biopolímeros, propriedades dos filmes e efeitos de extrato de beldroega nos filmes

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Mauro
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Fabio Yamashita
UEL –Londrina

Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Freitas Moraes
USP – Câmpus de Pirassununga

Prof^a. Dr^a. Vânia Regina Nicoletti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Natália Soares Janzantti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
23 de fevereiro de 2022

Aos meus pais, Célia e Luiz,
e aos meus irmãos, Letícia (*in memoriam*) e Ronaldo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, pela força, fé e por me cercar de pessoas especiais, que me dão força, me apoiam e acreditam em mim.

Aos meus avós, pais e irmãos pelo amor incondicional, por todo apoio e força durante todos os momentos. Agradecimento especial à minha irmã (*in memoriam*) e meu avô Geraldo (*in memoriam*) por tanto amor, tantos ensinamentos de vida e por caminharem sempre ao meu lado.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Mauro, por quem tenho enorme carinho e admiração. Sou muito grata por me acolher há mais de nove anos como sua orientanda, por tantos ensinamentos, correções, incentivo, e por tanto carinho, compreensão e paciência.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Keila de Souza Silva, que também me acompanhou desde a iniciação científica, pelos ensinamentos, sugestões, disponibilidade e apoio.

Ao Yuri, pelo companheirismo, carinho e apoio.

As minhas amigas de laboratório e vida, Ana Filippin, Ana Maria, Kati, Lê, Lili, Maísa e Mari. Agradeço pela ajuda no laboratório, paciência, conselhos, risadas, com certeza tudo se tornou mais leve com vocês.

Ao Kayque pela ajuda nas análises de atividade antioxidante.

Agradeço a todos os professores e técnicos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP, pelos valiosos ensinamentos.

As professoras Dra. Vânia Regina Nicoletti e Dra. Aline Margarete Furuyama Lima pelas correções da qualificação.

Aos professores membros da banca examinadora por aceitarem o convite e pelas correções da tese.

À professora Dra. Márcia Perez dos Santos Cabrera, por ter disponibilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Processo FAPESP 2012/24259-0) para realização da análise do potencial zeta.

À professora Vânia por ceder seu laboratório para o uso do reômetro.

Ao Prof. Dr. Odílio Garrido de Assis e a técnica Silviane Zanni Hubinger pela possibilidade de realizar a análise de FTIR na EMBRAPA Instrumentação de São Carlos. Agradeço também à Jéssica e à Elisa pela ajuda.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal – LMMC, Fapesp 2004/08868-0, da USP de Ribeirão Preto, pela disponibilidade da utilização do microscópio confocal, e à técnica Elizabete Rosa Milani pelo auxílio na análise.

Ao técnico Alberto Camilo Alécio, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pela análise de FTIR nas amostras do Capítulo 4.

Agradeço ao LMA-IQ da UNESP de Araraquara, pela disponibilidade da utilização do microscópio eletrônico de varredura, e ao técnico Diego Tita.

À Flávia Villas Boas pela ajuda na utilização do Difractômetro de Raio-X e no cálculo do Índice de cristalinidade.

À professora Dra. Ana Carolina Conti e Silva pela disponibilidade da utilização do texturômetro.

À empresa Legus Agroindustrial Ltda pela disponibilidade da seladora a vácuo e à engenheira Ana Beatriz pela ajuda na selagem.

À Danisco pela doação do alginato de sódio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro à pesquisa, por meio do projeto de pesquisa de que participo (Processo nº 2020/05254-4).

Minha enorme gratidão a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização desse trabalho.

“O aprendizado é uma chuva de rejuvenescimento para o cérebro”

Ana Claudia Quintana Arantes (2021, p. 35)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi investigar misturas de proteína isolada de soja (SPI) e alginato de sódio (ALG) em diferentes pHs e concentrações do polissacarídeo, bem como propriedades dos filmes elaborados a partir desses biopolímeros e efeitos da adição de extrato de beldroega (*Portulaca oleracea* L.) (EB). Soluções e filmes à base de SPI (5% m/m de solução filmogênica) com adição de diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% m/m de solução filmogênica) de ALG foram elaborados em pH 6, 8 e 11. As soluções foram caracterizadas por propriedades reológicas, FTIR e microscopia confocal a laser, e os filmes comestíveis quanto a propriedades estruturais (FTIR e Raio-X), morfológicas (microscopia eletrônica de varredura), mecânicas (tensão, alongação na ruptura e módulo de Young), óticas (parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , opacidade e transmitância) e de barreira (ao vapor de água e ao oxigênio), além de sua interação com a água (umidade, solubilidade e isoterma de sorção de água). Filmes de SPI (5%) e SPI (5%) - ALG (1%) foram avaliados sem e com adição de EB, nas concentrações de 2,5; 3,75 e 5% m/m de solução filmogênica, quanto às suas propriedades, exceto a de sorção de água, e foi determinada sua atividade antioxidante pelo método DPPH. Por fim, foram analisadas propriedades de barreira (ao vapor de água, oxigênio e à luz) do polietileno de alta densidade (PEAD) e este foi comparado aos filmes biodegradáveis à base de SPI, avaliando-se o desempenho desses filmes como embalagem tipo sachê para *chips* de manga. Alterações de qualidade das amostras envasadas a vácuo foram analisadas quanto aos parâmetros de cor, conteúdo de β -caroteno e atividade antioxidante (pelos métodos ABTS e DPPH). Como principais resultados nas soluções de SPI-ALG a concentração 0,75% ALG e pHs 6 e 8 foram as condições que proporcionaram maior força do gel. Em relação aos filmes, verificou-se que a adição do polissacarídeo aumentou a opacidade, solubilidade e melhorou as propriedades mecânicas dos filmes à base de SPI, com particularidades para cada pH. No pH 11 a adição de ALG reduziu significativamente a permeabilidade ao oxigênio dos filmes, atingindo uma redução de 132% com concentração de 1% ALG. A adição de EB nos filmes simples (SPI) e compostos (SPI-ALG) não causou alterações nas estruturas moleculares (FTIR), no entanto, aumentou a opacidade e a atividade antioxidante. Além disso, nos filmes SPI-ALG aumentou a resistência à tensão. Filme comercial de PEAD apresentou menor permeabilidade ao vapor da água e opacidade e maior permeabilidade ao oxigênio quando comparado aos filmes biodegradáveis estudados. Em relação ao estudo de armazenamento, no geral, filme composto (SPI-ALG) parece ter sido o que mais contribuiu para manutenção da qualidade dos *chips* de manga, apresentando menor taxa de alteração de cor entre os filmes biodegradáveis e menor

taxa de degradação de β -caroteno entre todos os filmes analisados. Apesar da necessidade de estudos mais aprofundados, os filmes à base de SPI-ALG demonstraram grande potencial como embalagem biodegradável de alimentos desidratados.

Palavras-chave: Filmes biodegradáveis. Proteína isolada de soja. Alginato de sódio. pH. *Portulaca oleracea* L.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate mixtures of soy protein isolate (SPI) and sodium alginate (ALG) at different pHs and polysaccharide concentrations, as well as properties of films made from these biopolymers and effects of the addition of purslane extract (*Portulaca oleracea* L.) (EB). Solutions and films based on SPI (5% w/w filmogenic solution) with the addition of different concentrations (0; 0.25; 0.5; 0.75 and 1% w/w filmogenic solution) of ALG were prepared at pH of 6, 8 and 11. The solutions were characterized by rheological properties, FTIR and confocal laser microscopy, and the edible films regarding structural (FTIR and X-ray), morphological (scanning electron microscopy), mechanical (tensile strength, elongation at break and Young's modulus), optical properties (L^* , a^* and b^* color parameters, opacity and transmittance) and barrier parameters (to water vapor and oxygen), in addition to their interaction with water (moisture, solubility and water sorption isotherm). The properties of films, but water sorption, of SPI (5%) and SPI (5%) - ALG (1%) were evaluated with and without the addition of EB, at concentrations of 2.5; 3.75 and 5% w/w filmogenic solution and their antioxidant activity was determined by the DPPH method. Finally, barrier properties (to water vapour, oxygen and light) of high-density polyethylene (HDPE) were analyzed and was compared to SPI-based biodegradable films, evaluating the performance of these films applied as packaging (as sachet-type) for mango chips. Changes in the quality of the vacuum-packed samples were analyzed for color parameters, β -carotene content and antioxidant activity (by ABTS and DPPH methods). As main results in the SPI-ALG solutions, the concentration of 0.75% ALG and pHs of 6 and 8 were the conditions that provided greater gel strength. Regarding the films, it was found that the addition of polysaccharide increased the opacity, solubility and improved the mechanical properties of the SPI-based films, with particularities for each pH. At pH 11, the addition of ALG significantly reduced the oxygen permeability of the films, reaching a reduction of 132% at a concentration of 1% ALG. The addition of EB in simple (SPI) and composite (SPI-ALG) films did not cause changes in molecular structures (FTIR), however, it increased opacity and antioxidant activity. Furthermore, in the SPI-ALG films, the tensile strength increased. Commercial film (HDPE) showed lower water vapor permeability and opacity and higher oxygen permeability in comparison to the biodegradable films studied. Regarding the storage study, in general, composite film (SPI-ALG) seems to have contributed the most to maintaining the quality of mango chips, showing a lower rate of color change among the biodegradable films and a lower rate of β -carotene degradation among the

analyzed films. Despite the need for further studies, SPI-ALG-based films have shown great potential as biodegradable packaging for dried foods.

Keywords: Biodegradable films. Soy protein isolated. Sodium alginate. pH. *Portulaca oleracea* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Estrutura química do alginato de sódio.	29
Figura 1.2 – Possíveis interações entre dois componentes de um sistema de biopolímeros, ex., uma mistura de proteína com polissacarídeo.	32
Figura 1.3 – Plantas de <i>Portulaca oleracea</i> L. espontâneas.	39
Figura 2.1 – Potential zeta em função do pH, (a) solução de SPI e ALG e (b) solução SPI-ALG com diferentes concentrações de ALG.	59
Figura 2.2 – Região de viscoelasticidade linear para blendas de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c) na frequência de $5 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ e temperatura ambiente (25°C).	60
Figura 2.3 – Variação de G' e G'' com a frequência angular para blendas de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c) (Símbolos preenchidos para G' e símbolos vazios para G'').	63
Figura 2.4 – Espectros FTIR do pó de SPI (a) e do pó de ALG (b).	65
Figura 2.5 – Espectros de infravermelho das blendas de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c).	67
Figura 2.6 – Imagens da microscopia confocal a laser das soluções de SPI (5%): (a) a (e) 0; 0,25; 0,5; 0,75; e 1% ALG, respectivamente; 1) pH 6; 2) pH 8; e 3) pH 11.	70
Figura 3.1 – Corpo de prova antes do rompimento durante análise das propriedades mecânicas TA.XT PLUS.	83
Figura 3.2 – Determinação de isotermas: cápsulas contendo amostras no interior de pote hermético (a) e cápsula durante pesagem (b).	85
Figura 3.3 - (a) cápsula de alumínio com sistema de rosca e vedação de borracha, (b) filme acondicionado na cápsula, (c) dessecadores armazenados em incubadora a 25°C .	87
Figura 3.4 – Espectro de FTIR da SPI em pó (a), ALG em pó (b) e glicerol (c).	91
Figura 3.5 – Espectro de FTIR dos filmes de SPI e SPI-ALG no pH 6 (a), pH 8 (b), e pH 11 (c).	93
Figura 3.6 – Superfície dos filmes SPI (5%) com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, respectivamente, no pH 6 (1), pH 8 (2) e pH 11 (3). Aumento de $250\times$.	96
Figura 3.7 – Superfície dos filmes SPI (5%) com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, respectivamente, no pH 6 (1), pH 8 (2) e pH 11 (3). Aumento de $10.000\times$.	97
Figura 3.8 – Seção transversal dos filmes SPI (5%) com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, respectivamente, no pH 6 (1), pH 8 (2) e pH 11 (3). Aumento de $250\times$.	98

Figura 3.9 – Espectro de raio X da SPI em pó (a) e ALG em pó (b).	99
Figura 3.10 – Espectro de raio X dos filmes SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (a), 8 (b) e 11 (c).	100
Figura 3.11 – Transmitância dos filmes de SPI e SPI/ALG com diferentes concentrações de ALG, nos diferentes pHs, sendo (a) pH 6, (b) pH 8 e (c) pH 11.	110
Figura 3.12 – Isotermas de sorção dos filmes à base de SPI (5%) e ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c).	115
Figura 4.1 – Etapas para obtenção da beldroega seca e triturada.	136
Figura 4.2 – Espectro de FTIR da SPI em pó, ALG em pó e EB liofilizada.	142
Figura 4.3 – Espectro de FTIR dos filmes elaborados com SPI e EB em diferentes concentrações, em % (a) e SPI-ALG com EB nas mesmas concentrações (b).	144
Figura 4.4 – Microestrutura dos filmes elaborados com SPI (5%) e EB em diferentes concentrações: (a-d) 0; 2,5; 3,75 e 5%, respectivamente; e SPI (5%) + ALG (1%) com EB nas mesmas concentrações (e-h) 0; 2,5; 3,75 e 5%, respectivamente; 1) transversal de 250×; 2) superfície de 250×; e 3) superfície de 10.000×.	146
Figura 4.5 – Espectro de raio X da SPI em pó (a) e ALG em pó (b).	147
Figura 4.6 – Espectro de raio X dos filmes elaborados com SPI e EB em diferentes concentrações (a) e SPI-ALG com EB nas mesmas concentrações (b).	148
Figura 4.7 – Fotos dos filmes elaborados com SPI (5%) sem (a) e com adição de ALG (1%) (b), acrescidos de EB em diferentes concentrações: (1) a (4): 0; 2,5; 3,75 e 5%, respectivamente.	153
Figura 4.8 – Transmitância dos filmes elaborados com SPI (5%) sem (a) e com adição de alginato de sódio (b), com diferentes concentrações de extrato de beldroega (EB).	154
Figura 5.1 – Processo de envase e embalagens finais de cada formulação, sendo (a) chips de manga antes do envase, (b) envase a vácuo, (c) armazenamento em BOD, (d) embalagens após envase: 1 – PEAD, 2 – SPI, 3 – SPI-EB, 4 – SPI-ALG, (5) – SPI-ALG-EB.	171
Figura 5.2 – Umidade (a) e atividade de água (b) dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	179
Figura 5.3 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro L* de cor dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	181
Figura 5.4 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro b* de cor dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	182
Figura 5.5 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro C* de cor dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	183

Figura 5.6 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro h (hue) da cor dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	184
Figura 5.7 – Modelo cinético de ordem zero da diferença total de cor (DE*) dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	185
Figura 5.8 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração de β -caroteno dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	186
Figura 5.9 – Atividade antioxidante pelo método ABTS (μM de trolox $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de chips de manga) das amostras armazenadas nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	187
Figura 5.10 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração da atividade antioxidante pelo método DPPH (μM de trolox $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de chips de manga) das amostras armazenadas nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.	189
Figura A.1 – Potencial zeta de soluções aquosas de SPI a diferentes forças iônicas (0, 20 e 50 mM) sem e com segundo aquecimento (70 °C por 20 min).	197
Figura A.2 – Potencial zeta de soluções aquosas de SPI (a), alginato (b) e misturas de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato (c a f: 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) em diferentes pH's (2 a 11) e diferentes forças iônicas (0, 20 e 50 mM).	199
Figura B1 – Soluções de SPI (5%) e ALG (1%) pH 11 a diferentes concentrações de sal (0, 20 e 50 mM), (a) deformação versus G' a 5 rad $\cdot\text{s}^{-1}$; (b) G' e G'' versus frequência, na deformação 0,02.	201
Figura C1 – Filmes biodegradáveis elaborados a partir de SPI e filmes compostos de SPI com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, no pH 11.	202
Figura D1 – Fotos das embalagens retiradas em cada dia de análise, com as formulações na seguinte ordem: PEAD, SPI, SPI-ALG, SPI-EB e SPI-ALG-EB	203

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Parâmetros do ajuste do modelo da Lei da Potência para G' e G'' nas soluções SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG em diferentes pHs, força iônica de 20 mM, e temperatura ambiente (25°C).	64
Tabela 3.1 – Umidade relativa das soluções salinas saturadas a 25 °C.	85
Tabela 3.2 – Índices de cristalinidade relativa (ICR) dos filmes de SPI adicionados de diferentes concentrações de ALG e elaborados em diferentes pHs.	101
Tabela 3.3 – Espessura (mm), Tensão (MPa), deformação na ruptura (%) e módulo de Young (MPa) dos filmes SPI (5%), nos pHs (6, 8 e 11), e acrescidos de diferentes concentrações de alginato (0,25; 0,5; 0,75 e 1%).	105
Tabela 3.4 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) e opacidade com diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs.	108
Tabela 3.5 – Teor de água (g/100 g amostra) e solubilidade em água dos filmes de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs.	113
Tabela 3.6 – Parâmetro do modelo de GAB ajustado aos dados experimentais dos filmes a base de SPI e diferentes concentrações de ALG e pHs.	116
Tabela 3.7 – Permeabilidade ao vapor de água ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$), densidade (g/m^3), coeficiente de solubilidade ($\text{g}/\text{g}\cdot\text{Pa}$) e coeficiente de difusão (m^2/s) dos filmes de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs.	120
Tabela 3.8 – Espessuras (mm) e coeficientes de permeabilidade ao oxigênio (PO_2) de filmes de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato, no pH 11.	122
Tabela 4.1 – Cristalinidade relativa das matérias-primas e dos filmes biodegradáveis.	149
Tabela 4.2 – Espessura e propriedades mecânicas (tensão, deformação na ruptura e módulo de Young) dos filmes sem e com adição de diferentes concentrações de extrato de beldroega.	151
Tabela 4.3 – Parâmetros de cor e opacidade dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição de diferentes concentrações de extrato de beldroega.	153
Tabela 4.4 – Umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição de extrato de beldroega.	156
Tabela 4.5 – Atividade antioxidante pelo método DPPH do extrato de beldroega e dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição de diferentes concentrações do extrato.	157
Tabela 5.1 – Espessuras (mm), permeabilidade ao vapor de água ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$) e ao oxigênio (PO_2) e opacidade dos filmes de SPI (5%) e SPI (5%)-ALG (1%), ambos sem e com adição de EB (5%), e do filme de polietileno de alta densidade (PEAD).	177

Tabela E.1 – Atividade antioxidante pelos métodos ABTS*+ e DPPH de chips de manga com diferentes soluções extratoras.	204
Tabela F.1 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE) dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante estocagem à 25 °C.	205
Tabela F.2 – Conteúdo de β -caroteno ($\mu\text{g/g}$ amostra) dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante estocagem à 25 °C.	207
Tabela F.3 – Atividade antioxidante (AA) pelos métodos ABTS e DPPH, em μM de Trolox/100g amostra, dos chips de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante estocagem à 25 °C.	208

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
OBJETIVOS DA PESQUISA	23
Objetivo Geral	23
Objetivos Específicos	23
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1 Filme comestível	25
1.2 Proteína isolada de soja	27
1.3 Alginato de sódio	29
1.4 Interações entre proteínas e polissacarídeos	31
1.4.1 Proporção proteína/ polissacarídeo	32
1.4.2 pH	34
1.4.3 Força iônica	35
1.4.4 Temperatura	35
1.5 Filmes comestíveis com adição de extrato antioxidante	36
1.6 <i>Portulaca oleracea</i> L. (BELDROEGA)	38
REFERÊNCIAS	40
2 EFEITO DO PH E DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO EM MISTURAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA E ALGINATO DE SÓDIO	51
RESUMO	51
2.1 Introdução	51
2.2 Materiais e Métodos	53
2.2.1 Materiais	53
2.2.2 Preparação das soluções	54
2.2.2.1 <i>Solução estoque</i>	54
2.2.2.2 <i>Soluções SPI-ALG</i>	54
2.2.3 Análises em solução	55
2.2.3.1 <i>Potencial Zeta</i>	55
2.2.3.2 <i>Propriedades reológicas</i>	55
2.2.3.3 <i>FTIR-ATR</i>	56
2.2.3.4 <i>Microscopia confocal de varredura a laser</i>	56
2.2.4 Análises estatísticas	56
2.3 Resultados e Discussão	57
2.3.1 Potencial zeta	57
2.3.2 Análises reológicas	59
2.3.2.1 <i>Varredura de deformação</i>	59

2.3.2.2 Varredura de Frequência	61
2.3.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	65
2.3.4 Microscopia confocal	68
2.4 Conclusões	71
REFERÊNCIAS	71
3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E DO PH EM FILMES À BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA	77
RESUMO	77
3.1 Introdução	77
3.2 Material e Métodos	80
3.2.1 Materiais	80
3.2.2 Elaboração dos filmes comestíveis	80
3.2.3 Caracterização dos filmes de SPI e SPI-ALG	81
3.2.3.1 Espessura	81
3.2.3.2 Análise por Infravermelho de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	81
3.2.3.3 Análises morfológicas	81
3.2.3.4 Difração de Raios-X e cristalinidade relativa	82
3.2.3.5 Propriedades mecânicas	82
3.2.3.6 Propriedades óticas	83
3.2.3.7 Teor de água	83
3.2.3.8 Solubilidade em água	84
3.2.3.9 Isotermas	84
3.2.3.10 Permeabilidade ao vapor de água	86
3.2.3.11 Densidade dos filmes	87
3.2.3.12 Transferência de massa em filmes	87
3.2.3.13 Permeabilidade ao oxigênio	89
3.2.4 Análise estatística	89
3.3 Resultados e Discussão	90
3.3.1 FTIR	90
3.3.2 Análises morfológicas	94
3.3.3 Raio-X e cristalinidade relativa	99
3.3.4 Propriedades mecânicas	101
3.3.5 Propriedades óticas	106
3.3.6 Teor de água e solubilidade em água	110
3.3.7 Isotermas de sorção	113
3.3.8 Permeabilidade ao vapor de água	116
3.3.9 Densidade, coeficiente de solubilidade (β) e coeficiente de difusão (D^w)	118

3.3.10 Permeabilidade ao oxigênio	121
3.4 Conclusões	123
REFERÊNCIAS	124
4 EFEITO DA ADIÇÃO DE ALGINATO E DE EXTRATO DE BELDROEGA (PORTULACA OLERACEA L.) EM FILMES À BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA	132
RESUMO	132
4.1 Introdução	133
4.2 Materiais e Métodos	135
4.2.1 Materiais	135
4.2.2 Extrato de beldroega	135
4.2.3 Elaboração dos filmes	136
4.2.4 Caracterização dos filmes	137
4.2.4.1 <i>Espessura</i>	137
4.2.4.2 <i>Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	138
4.2.4.3 <i>Difração de Raios X (DRX)</i>	138
4.2.4.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	138
4.2.4.5 <i>Propriedades mecânicas</i>	138
4.2.4.6 <i>Propriedades óticas</i>	139
4.2.4.7 <i>Teor de água</i>	139
4.2.4.8 <i>Solubilidade em água</i>	139
4.2.4.9 <i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	139
4.2.4.10 <i>Determinação da capacidade antioxidante dos filmes</i>	140
4.2.4.10.1 <i>Extração dos compostos bioativos</i>	140
4.2.4.10.2 <i>Determinação da atividade antioxidante (AA)</i>	141
4.3 Resultados e Discussão	141
4.3.1 FTIR	141
4.3.2 Microestrutura	144
4.3.3 Difração de Raios X (DRX) e cristalinidade relativa	147
4.3.4 Propriedades mecânicas	149
4.3.5 Aparência visual e propriedades óticas	151
4.3.6 Teor de água, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água	155
4.3.7 Atividade antioxidante	156
4.4 Conclusões	157
REFERÊNCIAS	158
5 FILMES BIODEGRADÁVEIS E ATIVOS APLICADOS COMO EMBALAGENS DE CHIPS DE MANGA (MANGIFERA INDICA L.)	165

RESUMO	165
5.1 Introdução	166
5.2 Materiais e Métodos	168
5.2.1 Materiais	168
5.2.2 Elaboração dos filmes	169
5.2.3 Propriedades dos filmes	169
5.2.3.1 <i>Espessura</i>	169
5.2.3.2 <i>Permeabilidade ao vapor de água</i>	169
5.2.3.3 <i>Permeabilidade ao oxigênio</i>	170
5.2.3.4 <i>Opacidade</i>	170
5.2.4 Preparo das embalagens e armazenamento	170
5.2.5 Análises da manga durante armazenamento	172
5.2.5.1 <i>Umidade</i>	172
5.2.5.2 <i>Atividade de água</i>	172
5.2.5.3 <i>Cor</i>	172
5.2.5.4 <i>Carotenoides totais</i>	173
5.2.5.5 <i>Atividade antioxidante</i>	173
5.2.5.5.1 Extração dos compostos bioativos da manga	173
5.2.5.5.2 Determinação da Atividade antioxidante (AA) pelo método ABTS	174
5.2.5.5.3 Determinação da Atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH	174
5.2.6 Cinética de reação	174
5.2.7 Análises estatísticas	175
5.3 Resultados e Discussão	175
5.3.1 Propriedades de barreira dos filmes	175
5.3.2 Umidade e atividade de água da manga	177
5.3.3 Cor da manga	179
5.3.4 Conteúdo de β -caroteno das mangas	185
5.3.5 Atividade antioxidante da manga	187
5.4 Conclusões	189
REFERÊNCIAS	190
CONCLUSÕES GERAIS	195
PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	196
APÊNDICE A: INFLUÊNCIA DO PH, FORÇA IÔNICA E SEGUNDO AQUECIMENTO NA CARGA LÍQUIDA DAS SOLUÇÕES DE SPI, ALG E MISTURAS SOBRE O POTENCIAL ZETA.	197
APÊNDICE B: EFEITO DA FORÇA IÔNICA SOBRE OS ENSAIOS OSCILATÓRIOS DE SOLUÇÕES DE SPI (5%) COM ADIÇÃO DE ALGINATO (1%).	200

APÊNDICE C: IMAGENS DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS DE SPI E SPI-ALG	202
APÊNDICE D. EMBALAGENS DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES RETIRADAS EM CADA DIA DE ANÁLISE	203
APÊNDICE E. SOLUÇÃO EXTRATORA MAIS EFICAZ PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>CHIPS</i> DE MANGA	204
APÊNDICE F. PARÂMETROS DE COR (L^* , A^* , B^* , C^* , H E ΔE) (TABELA F1), CONTEÚDO DE B-CAROTENO (MG/G AMOSTRA SECA) (TABELA F2) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTES PELOS MÉTODOS ABTS E DPPH (TABELA F3) NOS <i>CHIPS</i> DE MANGA DURANTE OS 100 DIAS DE ARMAZENAMENTO.	205

INTRODUÇÃO GERAL

Os biopolímeros são de grande interesse nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, uma vez que são utilizados para diversas finalidades, como elaboração de géis, microcápsulas, espumas, emulsões, coberturas e filmes biodegradáveis, dentre tantas outras. No entanto, um único polímero muitas vezes não fornece todas as características desejadas, fazendo-se necessário a combinação de dois ou mais deles.

Vale mencionar que muitos fatores que alteram as características de misturas de biopolímeros, como composição, proporção de cada componente e pH da solução. O pH é de extrema importância na formação e estabilização de misturas de biopolímeros, uma vez que as propriedades eletrostáticas são altamente dependentes do pH, e deve ser avaliado.

A elaboração de filmes biodegradáveis visa reduzir o uso de embalagens à base de petróleo presentes no mundo todo, que provocam graves consequências ao meio ambiente. Devido à grande quantidade de resíduo gerado e ineficiente processo de reciclagem, é crescente o interesse por materiais biodegradáveis à base de biopolímeros.

Filmes biodegradáveis podem ser formados por proteínas, polissacarídeos ou lipídeos, além da combinação destes. Estudos sobre o desenvolvimento e caracterização de filmes a partir de mistura de proteínas e polissacarídeos têm sido conduzidos, e tem-se observado melhora nas propriedades de filmes compostos em relação a filmes simples, como na resistência mecânica e nas propriedades de barreira.

A proteína de soja representa uma das principais alternativas como fonte de proteína de origem vegetal. Ela tem se destacado na elaboração de filmes por ser biodegradável, abundante, apresentar baixo preço e possibilitar reações de *crosslinking*, uma vez que possui muitos grupos laterais reativos. A SPI é produzida a partir da farinha desengordurada de soja e apresenta mais de 90% de proteínas, sendo as principais a β -conglucina (7S) e a glicina (11S).

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear e aniônico extraído de algas marrons, e tem sido muito utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias devido a sua ausência de toxicidade, baixo custo, por ser biodegradável e apresentar boa biocompatibilidade.

Além da combinação proteína e polissacarídeo, um filme comestível pode conter compostos antioxidantes, enriquecendo e protegendo os alimentos que por ele forem embalados. Uma alternativa é o extrato de plantas, como a beldroega (*Portulaca oleracea* L.), uma erva daninha comestível rica em compostos bioativos, que podem conferir propriedades antioxidantes. Filmes biodegradáveis ativos têm sido aplicados como embalagens para diversos

produtos alimentícios, principalmente para alimentos com alta taxa de oxidação, e bons resultados têm sido observados.

Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo principal investigar interações entre SPI (5%) e ALG em diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) e diferentes pHs. Além disso, visou a elaboração e caracterização de filmes à base desses biopolímeros e a avaliação do acréscimo de diferentes concentrações de extrato de beldroega a uma formulação de filme de SPI e uma de SPI-ALG. Por fim, quatro diferentes formulações de filmes foram aplicadas como embalagem tipo sachê para *chips* de manga.

A tese está dividida em cinco capítulos:

O Capítulo 1 se refere à revisão bibliográfica geral, abordando temas investigados nesta pesquisa.

O Capítulo 2 apresenta o estudo de soluções de SPI e misturas de SPI-ALG em diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) e em diferentes pHs. Estas foram avaliadas quanto ao potencial zeta, propriedades reológicas, espectroscopia de infravermelho (FTIR) e microscopia confocal.

O Capítulo 3 aborda a elaboração e a caracterização de filmes à base de SPI. Realizou-se uma ampla caracterização de filmes formados apenas de SPI e de filmes compostos de SPI e ALG nos pHs 6, 8 e 11, com base em propriedades estruturais (FTIR e Raio X), microscopia eletrônica de varredura (MEV), propriedades mecânicas e óticas, umidade, solubilidade, isothermas de sorção e permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio.

O Capítulo 4 avalia a adição de diferentes concentrações de extrato de beldroega (*Portulaca oleracea* L.) (2,5; 3,75 e 5%) em filmes simples de SPI (5%) e compostos de SPI (5%) – ALG (1%) no pH 11. As propriedades dos filmes foram avaliadas por análises de espectroscopia de infravermelho (FTIR), Raio X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), propriedades mecânicas e óticas, permeabilidade ao vapor de água, umidade, solubilidade e atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

O Capítulo 5 compara propriedades dos filmes biodegradáveis (permeabilidade ao vapor da água e ao oxigênio e opacidade) com as do plástico convencional de polietileno de alta densidade (PEAD), e estuda o desempenho desses filmes na forma de embalagem tipo sachê para *chips* de manga. Alterações de qualidade de *chips* de manga envasados a vácuo foram

determinadas com base em parâmetros de cor, conteúdo de β -caroteno e atividade antioxidante (realizada pelos métodos ABTS e DPPH).

OBJETIVOS DA PESQUISA

Objetivo Geral

Avaliar as propriedades químicas, físicas e mecânicas da mistura de proteína isolada de soja com alginato de sódio e de filmes à base desses biopolímeros, bem como efeitos de extrato de beldroega nos filmes e aplicação de diferentes formulações como embalagem para *chips* de manga.

Objetivos Específicos

- Investigar propriedades de soluções de SPI (5%) e misturas SPI-ALG em diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%).
- Avaliar filmes simples à base de SPI (5%) e compostos à base de SPI (5%) e ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) em diferentes pHs (6, 8 e 11).
- Analisar a influência de diferentes concentrações de extrato de beldroega (2,5; 3,75 e 5%) em filme simples de SPI (5%) e filme composto SPI (5%) - ALG (1%), em pH 11.
- Avaliar permeabilidade ao oxigênio de embalagens biodegradáveis ativas (com extrato de beldroega) e compará-las à dos filmes sem extrato e do plástico convencional de polietileno de alta densidade (PEAD).
- Avaliar o desempenho de filmes biodegradáveis como embalagens tipo sachê para *chips* de manga, analisando a qualidade física e química das amostras ao longo do tempo de armazenamento em diferentes embalagens biodegradáveis e em embalagem de PEAD.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Filme comestível

Com o objetivo de reduzir o consumo de embalagens produzidas a partir do petróleo, matéria prima não renovável e cuja composição não é metabolizada por microrganismos, muitos pesquisadores têm estudado alternativas mais ecológicas. Uma opção, que vem sendo investigada por cientistas de diversas áreas em todo o mundo é a elaboração de filmes a partir de fontes renováveis e biodegradáveis, como as proteínas (ex.: glúten de trigo, zeína de milho, proteínas do soro de leite, proteínas de soja e gelatina), os polissacarídeos (ex.: pectina, celulose, alginato, quitosana, carragena e amido) e os lipídeos (ex.: monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácidos graxos) (GONTARD et al., 1996; CUQ et al., 1995; KOSHY et al., 2015).

Filmes e coberturas comestíveis são definidos como um material usado para embalar ou revestir alimentos, aumentando sua vida útil, e que podem ser consumidos juntamente com o alimento. Eles fornecem uma película de substituição e/ou fortificação a camadas naturais dos alimentos e, assim, evitam perdas de umidade e permitem a troca controlada de gases importantes, como oxigênio, dióxido de carbono e etileno, envolvidos nos processos de respiração dos vegetais. Um filme ou cobertura comestível pode ainda conter compostos bioativos, como agentes antioxidantes e antimicrobianos, enriquecendo e protegendo os alimentos neles contidos (PAVLATH; ORTS, 2009; WU et al., 2019). A diferença entre filme e cobertura está na forma de obtenção e aplicação nos alimentos, sendo que as coberturas são líquidas e aplicadas na superfície do alimento, na maioria das vezes por imersão, enquanto os filmes são utilizados na forma sólida, como embalagem.

A formação dos filmes depende de interações físicas, químicas e eletrostáticas entre os componentes para que ocorram ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros e se formem redes contínuas de polímeros (GENNADIOS et al., 1994). Depende também do tipo de processo, seja ele seco (extrusão ou termo compressão) (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008) ou úmido (*casting*), uma vez que taxas de secagem e condições de moldagem afetam a conformação das moléculas e a distância entre as mesmas e, consequentemente, suas interações (GENNADIOS et al., 1994).

O método *casting*, no qual o filme é formado após a evaporação do solvente, apesar de ser um processo lento e descontínuo, o que o inviabiliza para uma escala industrial, é o mais utilizado nas pesquisas em filmes baseados em proteínas, uma vez que é simples, reprodutível

na maioria dos laboratórios e é útil como primeira aproximação à formação de filmes (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014). Uma alternativa, para produzir filmes em larga escala e que já vem sendo testada em planta piloto, é o *casting* contínuo. Munhoz et al. (2018) produziram filmes de pectina e casca de maracujá-amarelo em *casting* contínuo utilizando temperatura de 120 °C por 7 min de secagem, obtendo uma produtividade de 0,03 m² de filme por minuto, e observaram que os filmes com 50% de casca de macacujá apresentaram resistência mecânica comparável à de filme de PVC, evidenciando o sucesso da técnica.

Filmes puros de proteínas ou polissacarídeos possuem algumas limitações, no entanto, uma maneira de compensar as deficiências de cada matéria prima é a elaboração de filmes compostos. Estudos sobre o desenvolvimento e caracterização de filmes a partir de mistura de proteínas e polissacarídeos têm sido conduzidos, e tem-se observado melhora em algumas propriedades, como mecânicas, de barreira e de solubilidade (SILVA et al., 2016; 2018; ARVANITOYANNIS et al., 1997; DI PIERRO et al., 2011; OSÉS et al., 2009; YOO; KROCHTA, 2011).

Osés et al. (2009), investigando filmes de WPI com acréscimo de goma mesquita (MG), observaram que a adição da goma melhorou a flexibilidade dos filmes. Os autores sugerem a utilização de goma mesquita para melhorar propriedades mecânicas de filmes de WPI como uma alternativa ao uso de grandes quantidades de plastificantes, pois estes aumentam a permeabilidade ao vapor de água dos filmes.

A mistura de proteínas e polissacarídeos pode ocasionar problemas relacionados à miscibilidade e solubilidade. Ferreira et al. (2009) verificaram incompatibilidade em filmes de quitosana e WPI, com separação de fases, mas que, eventualmente, poderiam ter aplicação em sistemas alimentícios em que os filmes comestíveis devessem se desintegrar ou dissolver facilmente durante o processo de cozimento ou mastigação.

Além das matérias primas utilizadas na composição dos filmes, muitos outros fatores podem ser estudados durante a elaboração dos mesmos. Entre eles, destaca-se a influência do pH (GENNADIOS et al., 1993; BRANDENBURG; WELLER; TESTIN, 1993; MANIGLIA et al., 2015), da força iônica (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2011), da concentração das matérias primas (FELIX et al., 2014; SILVA et al., 2018), do tratamento térmico da solução (STUCHELL; KROCHTA, 1994; SILVA et al., 2016), da agitação da solução (MASAMBA; LI; ZHONG, 2016), da adição de extratos naturais (FABRA et al., 2018; HAN; YU; WANG, 2018) ou nanopartículas (LI et al., 2016 b), do tipo e quantidade de plastificante (FAKHOURY et al., 2012) e de parâmetros de processo tais como a técnica utilizada para a obtenção do filme

(GARRIDO et al., 2013; CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014), além das condições de secagem (DENAVI et al., 2009) e das condições de armazenamento (ADILAH; HANANI, 2019).

A adição de plastificantes é essencial para formação de um filme adequado. Eles possuem baixa massa molecular e baixa volatilidade e, quando adicionados a materiais poliméricos, reduzem a temperatura de transição vítrea e melhoram a mobilidade das cadeias. Os plastificantes mais utilizados para materiais biodegradáveis baseados em biopolímeros são o glicerol e o sorbitol (FELIX et al., 2014; KOKOSZKA et al., 2010; GALDEANO et al., 2009; MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008; MALI et al., 2005). Mali et al. (2005) investigando o efeito dos plastificantes (glicerol, sorbitol e a mistura 1:1) em filmes de amido de mandioca, constataram que o glicerol exerceu um efeito plastificante mais efetivo.

1.2 Proteína isolada de soja

Segundo dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (2017) o Brasil produziu em 2017 mais de 114 milhões de toneladas de soja em grãos, o que o torna o segundo maior produtor do mundo, atrás somente dos Estados Unidos. Além disso, de acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) (2019), o Brasil vem melhorando a rentabilidade da produção de soja, através do uso de novas tecnologias, o que tem feito reduzir os custos e aumentar a produtividade.

A maior parte da soja produzida no mundo é encaminhada para as indústrias, que a utilizam, em sua maior parte, para extração de óleo de soja ou produção de farelo. A partir do farelo é extraída a proteína da soja, que representa, em massa, quase 80% da soja utilizada nas indústrias produtoras de óleo de soja. Portanto, por serem coprodutos de grandes indústrias, as proteínas da soja são consideradas biopolímeros abundantes, o que as tornam baratas. Além disso, é considerada uma matéria prima biodegradável, nutritiva (representa uma fonte de proteína de alta qualidade e pobre em gorduras saturadas), e tem sido cada vez mais importante nas dietas humanas (KOSHY et al., 2015; CAO et al., 2019; TANG, 2019). Alimentos à base de soja têm recebido atenção devido a seus efeitos benéficos a saúde, como na redução dos sintomas da menopausa (KURZER, 2008), redução de risco de alguns tipos de câncer (MESSINA; BENNINK, 1998), além de apresentarem efeitos protetores contra a obesidade, diabetes e doenças renais (TANG, 2019).

A soja tem sido uma das matérias primas mais utilizadas para produção de isolados proteicos, devido, sobretudo, ao seu elevado teor de proteínas e bom desempenho tecnológico.

Por ser uma matéria prima renovável, barata e biodegradável, ela também tem sido muito visada como fonte de proteína para a elaboração de filmes biodegradáveis (KOSHY et al., 2015; CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014; SONG et al., 2011). Além do seu potencial como material de embalagem na forma de filme, a proteína de soja apresenta inúmeras aplicações, como na fabricação de materiais fibrosos, espumas, adesivos, agentes liberadores de medicamentos, dentre outros (TIAN et al., 2018). Ela também tem sido considerada uma candidata para a fabricação de materiais hospitalares, tais como curativos, uma vez que produtos à base de soja podem promover a regeneração tecidual, integrar-se a coágulos sanguíneos e estimular a produção de colágeno (LI et al., 2016). A proteína de soja pode ser encontrada comercialmente em três formas, que são: farinha de soja (SF, *soy flour*, que contém 54% de proteína), proteína concentrada de soja (SPC, *soy protein concentrate*, 65-72% de proteína) e proteína isolada de soja (SPI, *soy protein isolate*, possui valor $\geq 90\%$ de proteína) (SONG et al., 2011). SF é produzida através da moagem da soja em pó fino, SPC é obtida pela remoção de parte dos carboidratos (açúcares solúveis) da soja descascada e desengordurada, e a SPI é obtida a partir da farinha desengordurada de soja, removendo a maioria dos componentes não proteicos (TIAN et al., 2018).

As proteínas da soja são compostas de uma mistura de albuminas e globulinas, das quais 90% são proteínas de armazenamento e que possuem estrutura globular. As duas principais proteínas da soja são a β -conglícinina (7S) e a glicina (11S), que correspondem a 35% e 52% da estrutura da proteína da soja, respectivamente. Além delas, mais duas categorias também são identificadas, as frações 2S (8%) e 15S (5%) (TIAN et al., 2018; TRAN; ROUSSEAU, 2013).

O ponto isoelétrico (pI) da solução de proteína de soja fica em pH entre 4,5 e 5 (JARAMILLO; ROBERTS; COUPLAND, 2011; LAM; PAULSEN; CORREDIG, 2008), no qual a SPI apresenta baixa solubilidade (em torno de 10%) devido à neutralização de carga, o que pode limitar sua aplicação em meios ácidos. Em valores de pH inferiores ao pI, os grupamentos amina da proteína estão carregados positivamente, possibilitando sua interação com polissacarídeos aniônicos, como pectina e alginato. Além disso, a adição de polissacarídeos pode aumentar a solubilidade da SPI próximo ao seu pI e impedir a formação de agregados muito grandes (JARAMILLO; ROBERTS; COUPLAND, 2011).

Alta solubilidade da SPI é observada em condições alcalinas, chegando a 100% em pH 11 (FREITAS; ALBANO; TELIS, 2017). Nessas condições, a proteína de soja apresenta melhor funcionalidade, uma vez que pode auxiliar na emulsificação de compostos hidrofóbicos e na ligação com a água em sistemas alimentícios (MALHOTRA; COUPLAND, 2004; FREITAS; ALBANO; TELIS, 2017). Em relação aos filmes à base de proteína isolada de soja

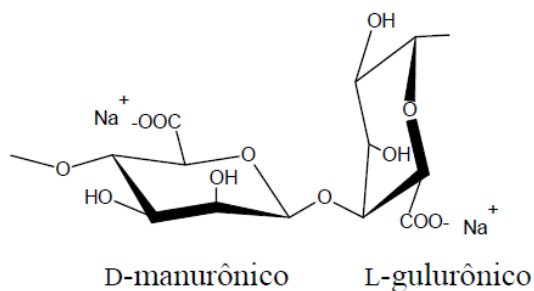
(SPI), estes vêm se mostrando promissores em muitas aplicações, por exemplo, em embalagens inteligentes, graças à alta capacidade de carregar e liberar substâncias de interesse, como agentes antimicrobianos (PAN et al., 2015b; ZHAO et al., 2013) e antioxidantes (HAN; YU; WANG, 2018; YUAN et al., 2017; WANG et al., 2016a).

No entanto, a aplicação de filmes de proteína de soja é limitada devido a sua fragilidade e alta absorção de umidade. Modificações físicas, químicas ou enzimáticas, incluindo aquecimento, ajuste de pH, mistura, hidrólise, reticulação, entre outros, são geralmente conduzidas para obter materiais à base de proteína de soja de alto desempenho. Entre as diferentes abordagens, os métodos físicos, como a mistura com plastificantes e com outros biopolímeros, demonstraram vantagens como fácil preparação e melhoria efetiva de propriedades dos filmes (FELIX et al., 2014; TIAN et al., 2018; GUERRERO et al., 2013; SUI et al., 2016). Sui et al. (2016), por exemplo, verificaram que a adição de goma guar em filmes de SPI, elaborados pelo método de *casting*, proporcionou filmes mais resistentes e com melhores barreiras à luz e ao oxigênio, quando comparados aos filmes sem a goma.

1.3 Alginato de sódio

O alginato de sódio (ALG) é extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*), incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, e *Macrocystis pyrifera*, através de tratamento com soluções aquosas alcalinas, normalmente NaOH. Assim como o alginato de cálcio ou potássio, o alginato de sódio é um polímero composto de monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e resíduos de α -L-ácido gulurônico (G) unidos por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1.1), e é sintetizado de três maneiras, blocos GG, MM ou ainda GM (LIMA, 2006; CAZÓN et al., 2017; LEE; MOONEY, 2012; OLIVAS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2008).

Figura 1.1 – Estrutura química do alginato de sódio.



Fonte: LIMA (2006)

O alginato é utilizado em diversas áreas, como na indústria biomédica, uma vez que sua biocompatibilidade e facilidade de gelificação, juntamente com a semelhança dos hidrogeis de alginato em relação às matrizes extracelulares dos tecidos, o torna altamente atrativo (LEE; MOONEY; 2012), podendo ser empregado, por exemplo, em impressões dentárias e curativos (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017). Alginato também é extensivamente utilizado na indústria alimentícia, principalmente como agente gelificante (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017), estabilizante e emulsificante (AUGST et al., 2006). Também tem se mostrado promissor em aplicações na forma de revestimentos ou filmes para limitar a desidratação de carnes, peixes e frutas, por exemplo (TAVASSOLI-KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; MASOUDPOUR-BEHABADI, 2016). Além disso, é usado nas indústrias de bebidas, na indústria têxtil e de papel, assim como na área farmacêutica, cuja matriz polimérica serve ao encapsulamento de diversos produtos, como medicamentos, proteínas, células e DNA (TAVASSOLI-KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; MASOUDPOUR-BEHABADI, 2016; ASHIKIN; WONG; LAW, 2010).

Além de todos os benefícios citados, o ALG também tem sido extensivamente investigado na elaboração de filmes e coberturas comestíveis, uma vez que possui boa biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e baixo preço (JIN et al., 2019; TAVASSOLI-KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; MASOUDPOUR-BEHABADI, 2016; LIMA, ANDREALI, SOLDI; 2007; RHIM, 2004). Os polissacarídeos geralmente formam filmes com boas propriedades mecânicas, mas devido a sua natureza hidrofílica, possuem propriedades deficientes de barreira. Alginato é um polissacarídeo que forma filmes com fraca barreira ao vapor da água, no entanto, sua alta higroscopicidade pode ser benéfica, sendo citada como uma vantagem por retardar a desidratação de alimentos sobre o qual é aplicado (FABRA et al., 2018; CAZÓN et al., 2017). Além disso, filmes de polissacarídeos são conhecidos por apresentarem boa barreira a gases, como o oxigênio (CAZÓN et al., 2017), reduzir a perda de aroma em vários produtos alimentícios (MILLER; KROCHTA, 1997), e de formar filmes com propriedades de transparência e mecânica favoráveis (DOU et al., 2018).

Quanto às suas propriedades em solução, sabe-se que sua viscosidade aparente aumenta à medida que o pH diminui, e atinge um máximo em torno do pH 3-3,5, uma vez que grupos carboxílicos se tornam protonados e formam interações de hidrogênio (LEE; MOONEY; 2012). Além disso, o alginato é um polieletrólito carregado negativamente acima do pH correspondente ao seu pKa, que fica em torno do pH 3,4 (PAN et al., 2015a).

1.4 Interações entre proteínas e polissacarídeos

Proteínas e polissacarídeos são dois dos principais componentes em formulações alimentícias e farmacêuticas. A interação entre esses componentes determina a funcionalidade, estabilidade e textura do sistema, que dependem principalmente da razão proteína/polissacarídeo, pH, força iônica e temperatura utilizada na solução (DING et al., 2019; MURILLO-MARTÍNEZ et al., 2011).

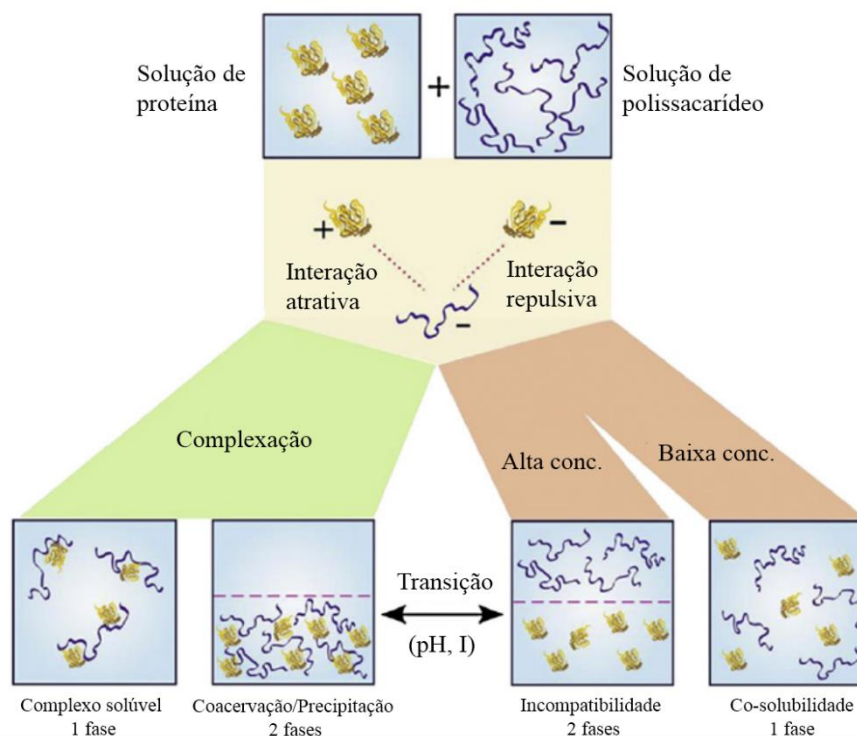
Há vários trabalhos na literatura considerando a mistura de proteínas e polissacarídeos, aplicados para diversos fins, como elaboração de géis (CHAUX GUTIERREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019), microencapsulação (ZHANG et al., 2016b), emulsões (TAVERNIER et al., 2017; ALBANO; NICOLETTI, 2018) e coberturas e filmes comestíveis (PIAZZA et al., 2009). Portanto, o entendimento das interações entre eles, nas mais diversas condições, oferece oportunidades para o desenvolvimento de novos ingredientes e produtos para a indústria de alimentos (YUAN et al., 2013; DICKINSON, 2011) e a indústria farmacêutica (PAN et al., 2015b).

As redes tridimensionais dos filmes são amplamente dependentes das interações intra e intermoleculares entre as proteínas e das interações entre proteínas e outros constituintes. O tipo e o número de interações (eletrostáticas, hidrofóbicas, de hidrogênio e pontes dissulfeto), estabelecidos pela composição de aminoácidos, pela massa molar média e pelo tipo e variáveis da técnica de processamento usada na obtenção do filme, determinam a microestrutura do material e, conseqüentemente, suas propriedades macroscópicas (MAURI; AÑÓN, 2006; CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014).

A mistura de polissacarídeos e proteínas na solução pode ser associativa (os biopolímeros se atraem) ou segregativa (ocorre repulsão entre os biopolímeros) dependendo do tipo de interação (DE KRUIF; TUINIER, 2001; MATALANIS; JONES; McCLEMENTS, 2011) (Figura 1.2). Na mistura associativa há uma atração relativamente forte entre os dois biopolímeros, o que faz com que eles se associem uns aos outros, sendo o exemplo mais comum a atração eletrostática entre moléculas com cargas opostas. A complexação entre os dois componentes pode levar à formação de complexos solúveis em uma única fase (1 fase) ou à formação de sistemas de duas fases (2 fases) como resultado de coacervação ou precipitação (2 fases), dependendo da natureza dos polímeros, da composição e das condições ambientais. O sistema de duas fases consiste em uma fase rica e uma fase pobre de ambos os biopolímeros. Na mistura segregativa existe uma repulsão relativamente forte entre os dois biopolímeros, o que ocorre se ambos, tanto a proteína quanto o polissacarídeo, tiverem cargas similares. Em

concentrações suficientemente baixas os dois biopolímeros se misturam e formam uma solução de uma fase, e quando a concentração excede um certo nível, ocorre separação de fases e formação de uma solução de duas fases, sendo cada fase composta por um polímero diferente (MATALANIS; JONES; McCLEMENTS, 2011; TANG, 2019) (Figura 1.2).

Figura 1.2 – Possíveis interações entre dois componentes de um sistema de biopolímeros, ex., uma mistura de proteína com polissacarídeo.



Fonte: Traduzido de MATALANIS, JONES e McCLEMENTS (2011)

1.4.1 Proporção proteína/ polissacarídeo

Como já citado, filmes biodegradáveis e/ou comestíveis produzidos a partir de fontes renováveis são alternativas interessantes para produzir revestimentos alimentícios ecologicamente corretos, podendo substituir os filmes à base de petróleo e assim reduzir os resíduos plásticos. A combinação de diferentes proporções de proteínas e polissacarídeos na forma de misturas oferece a possibilidade de criar diferentes filmes com características aprimoradas (PORTA et al., 2016; WANG; AUTY; KERRY, 2010; KRISTO; BILIADERIS; ZAMPRAKA, 2007).

Há vários relatos na literatura a respeito do efeito de diferentes concentrações de polissacarídeo ou proteína em soluções filmogênicas e sua influência nas propriedades dos filmes (AMADO; SILVA; MAURO, 2020; XU et al., 2005). Amado, Silva e Mauro (2020)

observaram que filme de SPI com adição de pectina mostrou melhora na barreira ao oxigênio e, também, com o aumento de seu conteúdo, quando esses filmes foram comparados com filmes formados apenas com proteína. Isso pode ser explicado quando se comparam propriedades de barreira de proteínas e polissacarídeos pois, de uma maneira geral, filmes formados por proteínas são menos permeáveis à água e mais permeáveis ao oxigênio devido à sua característica hidrofóbica, enquanto polissacarídeos, que possuem natureza polar, apresentam comportamento inverso (MILLER; KROCHTA, 1997). Silva et al. (2016) constataram que filmes à base de WPI se tornaram menos hidrofóbicos e diminuíram a permeabilidade ao oxigênio e ao gás carbônico com adição crescente de alfarroba, o que foi atribuído à natureza polar do polissacarídeo incorporado no filme em contraste com a natureza apolar do oxigênio.

Xu et al. (2005) avaliaram o efeito da proporção estequiométrica entre a quitosana e amido na propriedade mecânica dos filmes compostos, e observaram que o máximo valor de tração ocorreu com proporção estequiométrica 1:1, para ambos os amidos estudados (amido ceroso e amido de milho), o que foi atribuído à máxima interação entre os biopolímeros nessa proporção, devido à formação de interações de hidrogênio inter-moleculares entre o NH_3^+ da quitosana e o OH^- do amido.

A concentração de proteínas e polissacarídeos também influencia a formação de géis (CHAUX-GUTIÉRREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019) e emulsões (ALBANO; NICOLETTI, 2018). Chaux-Gutiérrez, Pérez-Monterroza e Mauro (2019) elaboraram géis de albumina (ALB) e pectina (PEC) em diferentes proporções e verificaram que o comportamento dos parâmetros G' (módulo de armazenamento) e G'' (módulo de dissipação de energia) depende da concentração de PEC. Um aumento do G' foi associado a um efeito de sinergismo entre a proteína e o polissacarídeo, sendo atribuído ao efeito do volume excluído (TOLSTOGUZOV, 1995). A teoria do volume excluído é relacionada à formação de fases em misturas de hidrocolóides e estabelece que numa mistura de dois biopolímeros, quando cada um ocupa uma fase distinta do volume da mistura, haverá um aumento da concentração local de cada um deles em relação à mistura sem separação de fases. Mesmo quando essa separação não ocorre extensivamente, os efeitos do volume excluído podem favorecer a agregação e a gelificação dos hidrocolóides (SANCHEZ et al., 1997; WANG et al., 2016b). Além disso, os autores observaram que a PEC pode afetar a estrutura secundária da ALB no sistema ALB-PEC, aumentando a agregação da proteína e a segregação dos biopolímeros.

1.4.2 pH

O pH das soluções influencia a desnaturação das proteínas, sendo uma das muitas variáveis que afetam a formação de filmes biodegradáveis (MAURI; AÑÓN, 2006). A elaboração de filmes à base de proteínas tem sido realizada em pH distante do seu ponto isoelétrico (pI), sendo que no pI da proteína, a coagulação não permite a formação de uma matriz homogênea (ROCHA et al., 2014; MAURI; AÑÓN, 2006). Já a alteração do pH para valores distantes do ponto isoelétrico causa o desdobramento da proteína, que passa para a forma de cadeia estendida, expondo seus grupos funcionais e aumentando as interações intermoleculares, o que propicia sua polimerização (CAO; FU; HE, 2007b, KOSHY et al., 2015).

Segundo Mauri e Añón (2006), a formação de filmes de proteína de soja foi alcançada em pH 1-3 e 6-12. Os autores também investigaram o comportamento da SPI durante a formação de filme, através de mudanças na solubilidade das soluções de SPI em valores de pH 2, 8 e 11, e observaram que filmes em pH 8 apresentaram maior solubilidade. Os resultados também indicaram que os filmes eram formados, principalmente, por β -conglucina (7S) e glicina (11S), as quais, dependendo do pH das soluções, se agregavam em diferentes formas durante a formação do filme. Ainda, segundo os autores, essas diferenças na estrutura das redes de proteínas afetariam as propriedades dos filmes.

Chae e Heo (1997) elaboraram filmes de proteína do soro de leite em vários pHs (4-12) e observaram formação de filmes em pH 6,75 a pH 9. Nos pHs baixos e próximos da região isoelétrica da proteína (4, 5 e 6) não foi possível a elaboração dos filmes devido à precipitação da proteína. Segundo os autores, nessa região ocorrem mudanças tridimensionais da proteína devido a mudanças nas ligações covalentes dissulfeto, ligações hidrofóbicas e interações de hidrogênio. Os autores consideraram que o pH da solução de proteína de soro desempenhou um papel importante nas propriedades físicas dos filmes de proteína do soro de leite.

Influência do pH também tem sido estudada em filmes biodegradáveis elaborados através da mistura de polímeros, porém, poucos trabalhos foram encontrados com essa abordagem (ROCHA et al., 2014; KIM; NETRAVALI, 2011). Rocha et al. (2014) elaboraram filmes com misturas de amido de mandioca e extrato proteico de soja e avaliaram a influência do pH sobre as suas propriedades (solubilidade, cor, resistência mecânica e permeabilidade ao vapor de água). Considerando como fatores desejáveis a baixa permeabilidade ao vapor da água, baixa solubilidade e boa resistência mecânica, encontraram que os melhores filmes seriam

os preparados em pH 6,1. No entanto, este depende de muitas condições, como fonte do polímero, concentrações dos componentes da formulação e utilização de plastificantes.

1.4.3 Força iônica

Como mencionado, a força iônica é um dos fatores que pode influenciar nas interações entre proteínas e entre proteínas e polissacarídeos. Vários autores têm pesquisado essa influência em diferentes formulações e preparos de soluções, com diferentes objetivos (XIONG et al., 2017; BENETTI; SILVA; NICOLETTI, 2019). Benetti, Silva e Nicoletti (2019) produziram microgéis de SPI sem adição de sal e com duas diferentes concentrações salinas (0,2 e 0,4%) e observaram que, embora a presença do sal monovalente não tenha afetado a estabilidade da emulsão elaborada, este provocou mudanças na microestrutura e no comportamento reológico das emulsões. Xiong et al. (2017), por sua vez, avaliaram o efeito da força iônica (20 a 400 mM) na formação de coacervados entre ovoalbumina (OVA) e carboximetilcelulose (CMC), e verificaram que a menor concentração favoreceu a formação de complexos e que o aumento da concentração salina enfraqueceu a interação entre os biopolímeros. Os autores atribuíram o ocorrido ao efeito de blindagem eletrostática provocado pelo excesso de íons de sal na solução.

Há também vários trabalhos na literatura que estudam os efeitos de diferentes concentrações salinas sobre a medida do potencial zeta. Salgin, Salgin e Behadir (2012) por exemplo, verificaram que diferentes tipos e concentrações de sal provocaram alterações na carga elétrica de diferentes biomoléculas (albumina sérica bovina, amilase, invertase e fenilalanina).

1.4.4 Temperatura

A temperatura e o tempo do tratamento térmico podem exercer influência sobre as propriedades de soluções e filmes formados por proteínas (STUCHELL; KROCHTA, 1994). Dentre os fatores químicos e físicos que induzem a desnaturação de proteínas, como pH, força elétrica, força mecânica e calor, este último é um dos mais utilizados. A desnaturação térmica da proteína ocorre tipicamente acima de um certo limiar de temperatura. Para SPI, esse limiar está geralmente entre 65 e 70 °C (KOSHY et al., 2015).

Jaramillo, Roberts e Coupland (2011), com o intuito de melhorar a solubilidade da proteína de soja em pHs baixos como os de uma bebida, estudaram os efeitos de diferentes

tratamentos térmicos sobre a estabilidade de complexos de SPI com pectina e mostraram que, apesar de suas propriedades sofrerem modificações com o calor, foi possível tratá-los termicamente junto com os demais ingredientes de uma bebida, garantindo a estabilidade microbiana e ainda mantendo a funcionalidade dos complexos nesse produto.

Filmes biodegradáveis à base de proteínas, como proteína isolada de soja e proteína isolada do soro de leite, podem sofrer alterações nas suas características devido ao tratamento térmico utilizado. Stuchell e Krochta (1994), por exemplo, compararam as propriedades mecânicas dos filmes formados por SPI sem e com aquecimento, e observaram que aqueles que passaram pela etapa de aquecimento apresentaram maior resistência mecânica e maior alongação na ruptura, quando comparados aos filmes sem tratamento térmico. A desnaturação das proteínas rompe interações de hidrogênio e de grupos não polares, levando a uma estrutura mais aberta que permite interações intermoleculares e ligações dissulfeto entre as cadeias de proteínas, com consequente polimerização e formação de um filme contínuo, coeso e com menor volume livre (MILLER; KROCHTA, 1997; BRINDLE; KROCHTA, 2008).

Silva et al. (2016) avaliaram filmes elaborados a partir de proteína do soro de leite (WPI) acrescida de goma alfarroba (LBG), em dois tratamentos térmicos (aquecendo a solução até 75 °C e imediatamente resfriando à temperatura ambiente e aquecendo até 75 °C, mantendo a essa temperatura por 10 min e depois resfriando), e observaram que o tratamento térmico mais severo foi importante para formar uma rede estável, formando uma matriz mais coesa e, consequentemente, filmes mecanicamente mais fortes, menos solúveis e com melhores propriedades de barreira a gases.

Maniglia et al. (2015) estudaram os efeitos da temperatura de aquecimento e do pH da solução em filmes de resíduo da extração de cúrcuma (que possui como principal biopolímero o amido), através da metodologia de superfície de resposta, e obtiveram melhores condições em temperatura de 85,1 °C e pH 8,1, com base nas melhores propriedades mecânicas e na menor solubilidade, demonstrando que as condições de aquecimento e pH influenciam nas ligações intermoleculares e nas propriedades dos filmes.

1.5 Filmes comestíveis com adição de extrato antioxidante

Embalagens ativas, como é o caso das embalagens com adição de compostos antioxidantes, corresponde a uma técnica na qual há interação entre compostos da embalagem e o alimento embalado. Essa técnica visa prolongar a vida útil do produto e vem recebendo

grande atenção em aplicações de armazenamento de alimentos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; RANGARAJ et al., 2021).

A deterioração dos alimentos é causada principalmente pela oxidação, que provoca redução da qualidade (como mudanças de cor devido à degradação de pigmentos, produção de sabores e odores indesejáveis), assim como redução do valor nutricional dos alimentos, ocasionada pela degradação de ácidos graxos essenciais, proteínas e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (NERÍN; TOVAR; SALAFRANCA, 2008; SANCHES-SILVA et al., 2014). Com isso, a indústria de alimentos tem buscado alternativas para reduzir estes efeitos. Uma alternativa, utilizada há bastante tempo, são as embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada, no entanto, os efeitos são reduzidos parcialmente, uma vez que é difícil retirar completamente o oxigênio dissolvido nos alimentos no momento do envase (SANCHES-SILVA et al., 2014).

Uma outra maneira de reduzir a degradação dos constituintes dos alimentos é a incorporação de antioxidantes a eles. Há diversas opções de antioxidante, no entanto, com a busca por um estilo de vida mais saudável, vem crescendo o interesse da indústria alimentícia na substituição de antioxidantes sintéticos, que podem apresentar efeito tóxico, por antioxidantes naturais (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014). A adição de antioxidantes naturais diretamente em formulações alimentícias pode inibir diversas reações e aumentar a vida útil dos produtos, portanto, tem sido muito utilizada em diversos alimentos, como em produtos cárneos (RIBEIRO et al., 2019) e óleos vegetais (JORGE et al., 2018). No entanto, mudanças nas características sensoriais podem tornar esses produtos indesejáveis. No caso de alimentos embalados, uma alternativa para prevenir reações indesejáveis e aumentar a vida útil dos produtos é a aplicação desses compostos na embalagem. Além disso, no caso de embalagens comestíveis à base de proteínas, quando compostos com atividade antioxidante são adicionados nas formulações, eles podem reagir com os aminoácidos da proteína e auxiliar no *crosslinking*, melhorando as propriedades dos filmes (CAO; FU; HE, 2007a).

A incorporação de antioxidantes naturais em filmes e coberturas comestíveis vem despertando cada vez mais interesse da comunidade científica, uma vez que esse processo pode reduzir a oxidação e até aumentar o valor nutricional dos alimentos, aumentar a resistência mecânica e barreira ao vapor da água (GANIARI; CHOULITOU DI; OREOPOULOU, 2017; RANGARAJ et al., 2021). Muitos autores investiram na incorporação de antioxidantes puros (padrões), como α -tocoferol, ácido caféico, catequina, quercetina e ácido ferúlico (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012; KANG et al., 2016; LI et al., 2021), no entanto, óleos e extratos vegetais com atividade antioxidante também estão sendo estudados e muitos resultados

promissores têm sido encontrados (HROMIŠ et al., 2015; MORADI et al., 2012; NAIR; SAXENA; KAUR, 2018; SAXENA; SHARMA; MAITY, 2020; SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010). Hromiš et al. (2015), por exemplo, adicionaram óleo essencial de cominho em filme de quitosana e verificaram aumento significativo da atividade antioxidante (28,96% no filme sem óleo e em torno de 80% nos filmes com adição de óleo, ambos analisados após 24 horas). Moradi et al. (2012), por sua vez, adicionaram óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme) e extrato da semente de uva também em filmes de quitosana e relataram melhora na taxa de permeabilidade ao vapor de água, no conteúdo de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante.

Em relação ao tempo de armazenamento, dependendo dos componentes e das condições em que os filmes foram elaborados pode ocorrer melhora ou piora de suas características, assim como dos produtos embalados por eles. Cao, Fu e He (2007a) estudaram filmes de gelatina com adição de ácido ferúlico e ácido tânico e verificaram que as propriedades dos filmes com ácido tânico podiam melhorar depois de armazenados por mais de 90 dias, enquanto as propriedades dos filmes com ácido ferúlico eram pouco afetadas pelo tempo de armazenamento. Souza et al. (2020) ao adicionarem extrato produzido a partir do cozimento da semente do pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) em filmes de SPI e o aplicarem como embalagem (tipo sachê) para óleo de linhaça, verificaram que o extrato contribuiu para estabilidade oxidativa do óleo e indicaram seu uso para embalagem biodegradável ativa. No entanto, até o momento, a maioria das aplicações dos filmes biodegradáveis adicionadas de extrato antioxidante são em produtos cárneos e pescados, como revestimento de carne bovina crua (BERMÚDEZ-ORIA et al., 2019), filé de peixe (CAI; WANG; CAO, 2020) e sardinhas salgadas (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012). Os autores utilizaram biopolímeros e extratos antioxidantes diferentes, porém todos notaram aumento da estabilidade dos produtos com adição do extrato nos filmes biodegradáveis.

1.6 *Portulaca oleracea* L. (BELDROEGA)

Plantas alimentícias não convencionais, conhecidas como PANCs, estão se destacando nos últimos anos com o surgimento de diversas pesquisas sobre seus efeitos benéficos à saúde. Essas plantas crescem em meio a outras cultivares convencionais, como plantação de limão e laranja, ou em locais abandonados, como beira de estrada e terrenos baldios (DESTA et al., 2020).

Portulaca oleracea L., pertencente à família das Portulacaceae, comumente conhecida por beldroega (Figura 1.3), pode ser considerada uma PANC. A beldroega é uma erva daninha e pode ser encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todos o mundo, crescendo em lugares como canteiros de flores e hortas e junto com plantações convencionais, sendo sua presença indicativo de solos férteis (NAGARANI et al., 2014; RANIERI et al., 2017).

Figura 1.3 – Plantas de *Portulaca oleracea* L. espontâneas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A beldroega tem sido utilizada para diversos fins, como na alimentação humana com o intuito de aumentar e diversificar o consumo de hortaliças, uma vez que possui grande potencial nutricional, na alimentação animal e em aplicações medicinais, como no auxílio do tratamento de queimaduras, picadas de insetos e escorpião e cicatrização de feridas. Além disso, essa planta possui uma variedade de constituintes químicos com atividades antitumorais, antidiabéticas, antimicrobianas e antiinflamatórias (NAGARANI et al., 2014; BARROS et al., 2017; CHEN et al., 2019; SARATALE et al., 2020; LEE; PARK; HAN, 2020). Seus constituintes químicos pertencem principalmente aos flavonóides, alcalóides, terpenóides, ácidos orgânicos e outros compostos naturais (como ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas, proteínas e minerais). No entanto, os flavonóides (Kaempferol, apigenina, luteolina, miricetina e quercetina) e os ácidos graxos essenciais são os principais constituintes dessa planta (FARKHONDEH; SAMARGHANDIAN, 2019; KUMAR et al., 2022).

Apesar de inúmeros estudos a respeito de seus nutrientes e efeitos benéficos à saúde, há na literatura poucos trabalhos que estudaram sua adição em produtos alimentícios. Dentre as pesquisas com a utilização da beldroega, avaliou-se sua aplicação na preservação de carne de porco resfriada (FAN et al., 2019), para enriquecimento de massa de macarrão (MELILLI et

al., 2020) e para redução de alterações indesejáveis no óleo de soja após aquecimento (JORGE et al., 2018).

REFERÊNCIAS

- ADILAH, Z. A. M.; HANANI, Z. A. N. Storage stability of soy protein isolate films incorporated with mango kernel extract at different temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 541–549, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100679>.
- ALBANO, K. M.; NICOLETTI, V. R. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 41, p. 562–571, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.018>.
- AMADO, L. R.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Effects of interactions between soy protein isolate and pectin on properties of soy protein-based films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 21, p. 48732, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.48732>.
- ASHIKIN, W. H. N. S.; WONG, T. W.; LAW, C. L. Plasticity of hot air-dried mannuronate- and guluronate-rich alginate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 104–113, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.002>.
- AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate Hydrogels as Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v.6, n. 8, p. 623–633, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>.
- ARANTES, A. C. Q. **Para vida toda valer a pena viver: pequeno manual para envelhecer com alegria**. 1 ed., Rio de Janeiro: Sextante, 2021, 160 p.
- ARVANITOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S.; YAMAMOTO, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 593–604, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00038-1).
- BARROS, A. S. A.; CARVALHO, H. O.; SANTOS, I. V. F.; TAGLIALEGNA, T.; SAMPAIO, T. I. S.; DUARTE, J. L.; FERNANDES, C. P.; CARVALHO, J. C. T. Study of the non-clinical healing activities of the extract and gel of *Portulaca pilosa* L. in skin wounds in wistar rats: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 182–190, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.142>.
- BENETTI, J. V. M.; SILVA, J. T. P.; NICOLETTI, V. R. SPI microgels applied to Pickering stabilization of O/W emulsions by ultrasound and high-pressure homogenization: rheology and spray drying. **Food Research International**, v. 122, p. 383–391, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.020>.
- BERMÚDEZ-ORIA, A.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G.; RUBIO-SENENT, F.; FERNÁNDEZ-PRIOR, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 148, p. 213–218, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.003>.

BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Edible films and coatings from soy protein. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p. 1086-1089, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06120.x>.

BRINDLE, L. P.; KROCHTA, J. M. Physical properties of whey protein-hydroxypropylmethylcellulose blend edible films. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 446-454, 2008. DOI: [10.1111/j.1750-3841.2008.00941.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00941.x).

CAI, L.; WANG, Y.; CAO, A. The physiochemical and preservation properties of fish sarcoplasmic protein/chitosan composite films containing ginger essential oil emulsions. **Journal of Food Process Engineering**, v. 13495, p. 1-12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13495>.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Mechanical properties of gelatin films crosslinked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 4, p. 575-584, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.001>.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1153-62, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.001>.

CAO, Z.; GREEN-JOHNSON, J. M.; BUCKLEY, N. D.; LIN, Q. Bioactivity of soy-based fermented foods: A review. **Biotechnology Advances**, 37, p. 223-238, 2019.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 522-528, 2011.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017.

CHAE, S.; HEO, T. Production and properties of edible film using whey protein. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 2, p. 122-125, 1997.

CHAUX-GUTIÉRREZ, A. M.; PÉREZ-MONTERROZA, E. J.; MAURO, M. A. Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 60-68, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.025>.

CHEN, D.; YAO, J.; LIU, T.; ZHANG, H.; LI, R.; ZHANG, Z.; GU, X. Research and application of *Portulaca oleracea* in pharmaceutical area. **Chinese Herbal Medicines**, v. 11, n. 2, p. 150-159, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2019.04.002>.

CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 193-204, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.013>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos (Março 2019)**. Brasília: CONAB, n. 6, v. 6, 2019.

CUQ, B., GONTARD, N., GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. In *Active Food Packaging*, M.L. Rooney (Ed.), Blackie Academic & Professional, Glasgow, p. 111–142, 1995.

DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1–8, 2017.

DE KRUIF, C.G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, 15, n. 4-6, p. 555-563, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00076-5).

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; AÑON, M. C.; SOBRAL, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 341-349, 2009.

DESTA, M.; MOLLA, A.; YUSUF, Z. Characterization of physico-chemical properties and antioxidant activity of oil from seed, leaf and stem of purslane (*Portulaca oleracea* L.). **Biotechnology Reports**, v. 27, e00512, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00512>.

DICKINSON, E. Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1966-1983, 2011.

DING, L.; HUANG, Y.; CAI, X.; WANG, S. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 133–141, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.015>.

DI PIERRO, P.; SORRENTINO, A.; MARINIELLO, L.; VALERIA L. C.; PORTA, R. Chitosan/whey protein film as active coating to extend ricotta cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2324 – 2327, 2011.

DOU, L.; LI, B.; ZHANG, K.; CHU, X.; HOU, H. Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1377–1383, 2018.

FABRA, M. J.; FALCÓ, I.; RANDAZZO, W.; SÁNCHEZ, G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 96-103, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.026>.

FAN, X.; LIU, S.; LI, H.; HE, J.; FENG, J.; ZHANG, X.; YAN, H. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipid oxidation and color of pork meat during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 147, p. 82–90, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.08.022>.

FAO (2017). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 14 March 2019.

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

FARKHONDEH, T.; SAMARGHANDIAN, S. The therapeutic effects of *Portulaca oleracea* L. in hepatogastric disorders. **Gastroenterol Hepatología**, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2019.

FÉLIX, M.; MARTÍN-ALFONSO, J. E.; ROMERO, A.; GUERRERO, A. Development of albumen/soy biobased plastic materials processed by injection molding. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 7-16, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.018>.

FERREIRA, C. O.; NUNES, C. A.; DELGADILLO, I.; LOPES-DA-SILVA, J. A. Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 807-813, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.005>.

FREITAS, M. L. F., ALBANO, K. M., TELIS, V. R. N. Characterization of biopolymers and soy protein isolate-high-methoxyl pectin complex. **Polímeros**, v. 27, p. 62-67, 2017.

GALDEANO, M. C.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 532-538, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.034>.

GANIARI, S.; CHOULITOU, E.; OREOPOULOU, V. Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 70-82, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.009>.

GARRIDO, T.; ETXABIDE, A.; PEÑALBA, M.; DE LA CABA, K.; GUERRERO, P. Preparation and characterization of soy protein thin films: Processing-properties correlation. **Materials Letters**, v. 105, p. 110-112, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.04.083>.

GENNADIOS, A.; BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L. TESTIN, R. F. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1835-1839, 1993.

GENNADIOS, A.; MCHUGH, T.H.; WELLE, C.L.; KROCHTA, J.M. Edible coatings and films based on proteins. In **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**, Edited by Krochta, J.M.; Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. Chapter 9, pp 201-277. Lancaster: Technomic Publishing Co, 1994.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, p. 42-51, 2014.

GONTARD, N.; THIBAUT, R.; CUQ, B.; GUILBERT, S. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1064-1069, 1996.

GUERRERO, P.; GARRIDO, T.; LECETA, I.; DE LA CABA, K. Films based on proteins and polysaccharides: Preparation and physical-chemical characterization. **European Polymer Journal**, v. 49, p.3713-3721, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.08.014>.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Preparation and characterization of antioxidant soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 13-21, 2018.

HERNANDEZ-IZQUIERDO, V.M.; KROCHTA, J.M. Thermoplastic processing of proteins for film formation – A review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 30-39, 2008.

HROMIŠ, N. M.; LAZIĆ, V. L.; MARKOV, S. L.; VAŠTAG, Z. G.; POPOVIĆ, S. Z.; ŠUPUT, D. Z.; DŽINIĆ, N. R.; VELIĆANSKI, A. S.; POPOVIĆ, L. M. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 86–93, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.001>.

JIN, S.; LI, K.; XIA, C.; LI, J. Sodium alginate-assisted route to antimicrobial biopolymer film combined with aminoclay for enhanced mechanical behaviors. **Industrial Crops & Products**, v. 135, p. 271–282, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.052>.

JORGE, N.; PIETRO, T. A.; LUZIA, D. M. M.; VERONEZI, C. M. Caracterização fitoquímica do óleo de soja adicionado de extrato de *Portulaca oleracea* L. **Revista Ceres**, v. 65, n. 1, p. 001-006, 2018.

JARAMILLO, D. P.; ROBERTS, R. F.; COUPLAND, J. N. Effect of pH on the properties of soy protein-pectin complexes. **Food Research International**, v. 44, p. 911-916, 2011.

KANG, H.; WANG, Z.; ZHANG, W.; LI, J.; ZHANG, S. Physico-chemical properties improvement of soy protein isolate films through caffeic acid incorporation and tri-functional aziridine hybridization. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 923-932, 2016.

KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Development of aligned-hemp yarn-reinforced green composites with soy protein resin: Effect of pH on mechanical and interfacial properties. **Composites Science and Technology**, v. 71, p. 541–547, 2011.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A.; VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 503-510, 2010.

KOSHY, R. R.; MARY, S. K.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A. Environment friendly green composites based on soy protein isolate – A review. **Food Hydrocolloids**, 50, 174 – 192, 2015.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; ZAMPRAKA, A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. **Food Chemistry**, v. 101, p. 753–764, 2007.

KUMAR, A.; SREEDHARAN, S.; KASHYAP, A. K.; SINGH, P.; RAMCHIARY, N. A review on bioactive phytochemicals and ethnopharmacological potential of purslane (*Portulaca oleracea* L.). **Heliyon**, v. 8, e08669, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08669>.

KURZER, M. S. Soy consumption for reduction of menopausal symptoms – A review. **Inflammopharmacology**, v. 16, p. 227–229, 2008. DOI: 10.1007/s10787-008-8021-z.

LAM, M.; PAULSEN, P.; CORREDIG, M. Interactions of soy protein fractions with high-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4726-4735, 2008.

LEE, J. H.; PARK, J. E.; HAN, J. S. *Portulaca oleracea* L. extract reduces hyperglycemia via PI3k/Akt and AMPK pathways in the skeletal muscles of C57BL/Ksj-db/db mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, 112973, 2020.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106-126, 2012. DOI: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.

LI, S.; DONNER, E.; XIAO, H.; THOMPSON, M.; ZHANG, Y.; REMPEL, C.; LIU, Q. Preparation and characterization of soy protein films with a durable water resistance-adjustable and antimicrobial surface. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 947-955, 2016.

LI, T.; XIA, N.; XU, L.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; CHI, Y.; ZHANG, Y.; LI, L.; LI, H. Preparation, characterization and application of SPI-based blend film with antioxidant activity. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, 100614, 2021.

LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 832-837, 2007.

LIMA, A. M. F. **Estudo de propriedades físico-químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos**. 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1376-1384, 2012.

MALHOTRA, A.; COUPLAND, J. N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 101-108, 2004.

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

MANIGLIA, B. C.; PAULA, R. L.; DOMINGOS, J. R.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 1187-1195, 2015.

MASAMBA, K.; LI, Y.; ZHONG, F. Effect of homogenization stirring speed on mechanical and water barrier properties of gallic acid treated zein-oleic acid composite films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 97-105, 2016.

MATALANIS, A.; JONES, O. G.; McCLEMENTS, D. J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1865-1880, 2011.

MAURI, A. N.; AÑÓN, M. C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1064-1072, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2457>.

MELILLI, M. G.; PAGLIARO, A.; SCANDURRA, S.; GENTILE, C.; STEFANO, V. D. Omega-3 rich foods: Durum wheat spaghetti fortified with *Portulaca oleracea*. **Food Bioscience**, v.37, 100730, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100730>.

MESSINA, M.; BENNINK, M. Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. **Baillikre's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 12, n. 4, p. 707-728, 1998.

MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 228-237, 1997.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, M. R.; OROMIEHIE, A. R.; MALEKINEJAD, H.; ALIAKBARLU, J.; HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 477-484, 2012.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 82-87, 2008.

MUNHOZ, D. R.; MOREIRA, F. K. V.; BRESOLIN, J. D.; BERNARDO, M. P.; SOUSA, C. P.; MATTOSO, L. H. C. Sustainable production and in vitro biodegradability of edible films from yellow passion fruit coproducts via continuous casting. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, p. 9883-9892, 2018.

MURILLO-MARTÍNEZ, M. M.; PEDROZA-ISLAS, R.; LOBATTO-CALLEROS, C.; MARTINEZ-PEREZ, A. VERNON CARTER, E. J. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, 577-585, 2011.

NAGARANI, G.; ABIRAMI, A.; NIKITHA, P.; SIDDHURAJU, P. Effect of hydrothermal processing on total polyphenolics and antioxidante potential of underutilized leafy vegetables, *Boerhaavia diffusa* and *Portulaca oleracea*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, p. S468-S477, 2014.

NAIR, M. S.; SAXENA, A.; KAUR, C. Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). **Food Chemistry**, v. 240, p. 245-252, 2018.

NERÍN, C.; TOVAR, L.; SALAFRANCA, J. Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 313-320, 2008.

OLIVAS, G. I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 359-366, 2008.

OSÉS, J.; FABREGAT-VÁZQUEZ, M.; PEDROZA-ISLAS, R.; TOMÁS, S. A.; CRUZ-OREA, A. & MATÉ, J. I. Development and characterization of composite edible film based on whey protein isolate and mesquite gum. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 56-62, 2009.

PAN, H.; XU, X.; TIAN, Y.; JIAO, A.; JIANG, B.; CHEN, J.; JIN, Z. Impact of phase separation of soy protein isolate/sodium alginate co-blending mixtures on gelation dynamics and gels properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 169-179, 2015a.

PAN, Y.; HUANG, X.; SHI, X.; ZHAN, Y.; FAN, G.; PAN, S.; TIAN, J.; DENG, H.; DU, Y. Antimicrobial application of nanofibrous mats self-assembled with quaternized chitosan and soy protein isolate. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 229–235, 2015b.

PAVLATH, A. E.; ORTS, W. Edible films and coating: Why, what, and how? In **Edible films and coatings for food applications**. EMBUSCADO, M. E.; HUBER, K. C. (EDITORS). Springer: New York, Chapter 1, pp. 2, 2009.

PIAZZA, L.; DÜRR-AUSTER, N.; GIGLI, J.; WINDHAB, E. J.; FISCHER, P. Interfacial rheology of soy proteins – High methoxyl pectin films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2125–2131, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.05.012>.

PORTA, R.; DI PIERRO, P.; SABBAB, M.; REGALADO-GONZALES, C.; MARINIELLO, L.; KADIVAR, M.; ARABESTANI, A. Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 245–251, 2016.

RANGARAJ, V. M.; RAMBABU, K.; BANAT, F.; MITTAL, V. Natural antioxidants-based edible active food packaging: An overview of current advancements. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101251, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101251>.

RANIERI, G. R.; REITER, A. S.; NASCIMENTO, V.; BORGES, F. **Guia prático sobre PANCs: Plantas alimentícias não convencionais**. 1. ed. São Paulo: Instituto Kairós, 2017, p. 1–40.

RHIM, J-W. **Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films**. Swiss Society of Food Science and Technology, v.37, p. 323–330, 2004.

RIBEIRO, J. S.; SANTOS, M. J. M. C.; SILVA, L. K. R.; PEREIRA, L. C. L.; SANTOS, I. A.; LANNES, S. C. S.; SILVA, M. V. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat Science**, v. 148, p. 181–188, 2019.

ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G.; CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C. Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 24, n. 5, p. 587–595, 2014.

SALGIN, S.; SALGIN, U.; BAHADIR, S. Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: The effects of ion types and ionic strengths. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 12404–12414, 2012.

SANCHES-SILVA, A.; COSTA, D.; ALBUQUERQUE, T. G.; BUONOCORE, G. G.; RAMOS, F.; CASTILHO, M. C.; MACHADO, A. V.; COSTA, H. S. Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n.3, p. 374–395, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.879215>.

SANCHEZ, C.; SCHMITT, C.; BABAK, V.G.; HARDY, J. Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration. **Nahrung**, v. 41, n. 6, p. 336–343, 1997.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; CHO, S.; GHODAKE, G.; BHARAGAVA, R. N.; PARK, Y.; MULLA, S. I.; KIM, D.; KADAM, A.; NAIR, S.; SHIN, H. Investigation of

photocatalytic degradation of reactive textile dyes by *Portulaca oleracea*-functionalized silver nanocomposites and exploration of their antibacterial and antidiabetic potentials. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 833, 2020.

SAXENA, A.; SHARMA, L.; MAITY, T. Enrichment of edible coatings and films with plant extracts or essential oils for the preservation of fruits and vegetables. **Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications**. Chapter 34, p. 859-880, 2020.

SILVA, K. S.; FONSECA, T. M. R.; AMADO, L. R.; MAURO, M. A. Physicochemical and microstructural properties of whey protein isolate-based films with addition of pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 122-128, 2018.

SILVA, K. S.; MAURO, M. A.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. M. R. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 179-188, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.028>.

SIRIPATRAWAN, U; & HARTE, B. R. Physical properties and antioxidante activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 770-775, 2010.

SONG, F.; TANG, D. L.; WANG, X. L.; WANG, Y. Z. Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 10, p. 3369-3380, 2011.

SOUZA, K. C.; CORREA, L. G.; SILVA, T. B. V.; MOREIRA, T. F. M.; OLIVEIRA, A.; SAKANAKA, L. S.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; VALDERRAMA, P.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Soy protein isolate films incorporated with pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) extract for potential use as edible oil active packaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, p. 998-1008, 2020.

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

SUI, C.; ZHANG, W.; YE, F.; LIU, X. YU, G. Preparation, physical, and mechanical properties of soy protein isolate/ guar gum composite films prepared by solution casting. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, 2016. DOI: 10.1002/APP.43382.

TANG, C. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review). **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 92-116, 2019.

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; SHEKARCHIZADEH, H.; MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 360-374, 2016.

TAVERNIER, I.; PATEL, A. R.; MEEREN, P. V.; DEWETTINCK, K. Emulsion-templated liquid oil structuring with soy protein and soy protein: k-carrageenan complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 107-120, 2017.

TIAN, H.; GUO, G.; FU, X.; YAO, Y.; YUAN, L.; XIANG, A. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 475-490, 2018.

TOLSTOGUZOV, V. B. Some physic-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 317-332, 1995.

TRAN, T.; ROUSSEAU, D. Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 382-392, 2013.

WANG, C.S.; NATALE, G.; VIRGILIO, N.; HEUZEY, M.R. Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 374-383, 2016b.

WANG, H.; HU, D.; MA, Q.; WANG, L. Physical and antioxidant properties of flexible soy protein isolate films by incorporating chestnut (*Castanea mollissima*) bur extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 33-39, 2016a.

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

WU, J.; SUN, Q.; HUANG, H.; DUAN, Y.; XIAO, G., LE, T. Enhanced physic mechanical, barrier and antifungal properties of soy protein isolate film by incorporating both plant-sourced cinnamaldehyde and facile synthesized zinc oxide nanosheets. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 31-38, 2019.

XIONG, W.; REN, C.; TIAN, M.; YANG, X.; LI, J.; LI, B. Complex coacervation of ovalbumin-carboxymethylcellulose assessed by isothermal titration calorimeter and rheology: Effect of ionic strength and charge density of polysaccharide. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 41-50, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.031>.

XU, Y. X.; KIM, K. M.; HANNA, M. A.; NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185-192, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.03.002>.

YOO, S. R.; KROCHTA, J. M. Whey protein-polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, n. 14, p. 2628-2636, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4502>.

YUAN, Y.; KONG, Z.Y.; SUN, Y.E.; ZENG, Q.Z.; YANG, X.Q. Complex coacervation of soy protein with chitosan: Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 171-179, 2017.

YUAN, Y.; WAN, Z.; YIN, S.; YANG, X.; QI, J.; LIU, G. ZHANG, Y. Characterization of complexes of soy protein and chitosan heated at low pH. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 657-664, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.034>.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; ZOU, L.; McCLEMENTS, D. J. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 308-315, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.015>.

ZHAO, S.; YAO, J.; FEI, X.; SHAO, Z.; CHEN, X. An antimicrobial film by embedding in situ synthesized silver nanoparticles in soy protein isolate. **Materials Letters**, v. 95, p. 142-144, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.12.106>.

Capítulo 2

*Efeito do pH e da concentração de polissacarídeo
em misturas de proteína isolada de soja e alginato
de sódio*

2 EFEITO DO pH E DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO EM MISTURAS DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA E ALGINATO DE SÓDIO

RESUMO

O objetivo do trabalho foi investigar a interação entre proteína isolada de soja (SPI) e alginato de sódio (ALG) em diferentes concentrações de ALG e diferentes pHs, avaliando a carga superficial e propriedades reológicas e estruturais de soluções de proteína e polissacarídeo. Soluções à base de SPI com acréscimo de diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) foram elaboradas e primeiramente foram avaliados os efeitos do pH (faixa de pH 2 a 11) e razão de proteína/polissacarídeo em relação às cargas líquidas nas dispersões. Em seguida, a partir da faixa de repulsão das cargas foram selecionados três pHs (6, 8 e 11). Os efeitos desses pHs e da razão de SPI/ALG foram analisados através da caracterização reológica dinâmica, espectroscopia no infravermelho (FTIR) e microscopia confocal de varredura a laser. Observou-se que as condições investigadas resultaram em alterações estruturais e físicas nas soluções de SPI e ALG. Misturas com concentração de 0,75% ALG em pH 6 e 8 apresentaram máxima força de gel, evidenciada pelos maiores valores do parâmetro A (constante relacionada à força do gel) da Lei da Potência, além de uma microestrutura mais homogênea. Nesses pHs a maior concentração de ALG (1%) analisada correspondeu à concentração crítica na mistura, nos quais notou-se uma queda do G' . No pH 11, entretanto, foram obtidos géis mais fracos que nos outros pHs e a concentração de 1% ALG levou a um aumento de G' em relação às menores concentrações de ALG. A partir de espectros de FTIR e microscopia confocal pode-se confirmar que o pH e a adição do polissacarídeo promovem mudanças estruturais na mistura SPI-ALG.

2.1 Introdução

Proteínas e polissacarídeos são dois dos principais componentes em formulações alimentícias e farmacêuticas, e uma vez que as propriedades desses biopolímeros puros apresentam certas limitações (BI et al., 2018; PAN et al., 2015). A combinação desses biopolímeros pode ser aplicada para diversos fins, como elaboração de géis, microencapsulação, emulsões e coberturas e filmes comestíveis, e o entendimento das interações entre eles, nas mais diversas condições, oferece oportunidades para o desenvolvimento de novos ingredientes e produtos (ALBANO; NICOLETTI, 2018; CHAUX-

GUTIÉRREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019; SILVA et al., 2018). A interação entre proteína e polissacarídeo depende, principalmente, do pH, força iônica, estado de desnaturação da proteína e razão proteína/polissacarídeo, que variam as cargas elétricas do sistema de biopolímeros (AMADO; SILVA; MAURO, 2020; CHAUX-GUTIÉRREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019; DING et al., 2019; ZHANG et al., 2016). Dentre esses fatores, sabe-se que o pH é de extrema importância na formação e estabilização de géis e emulsões produzidos por interação eletrostática entre proteína vegetal-polissacarídeo, uma vez que as propriedades eletrostáticas desses polímeros são altamente dependentes do pH (ALBANO; CAVALLIERI; NICOLETTI, 2019; LIN; KELLY; MIAO, 2021).

Dentre as proteínas de origem vegetal que podem ser utilizadas em substituição à proteína animal, a soja tem se destacado devido ao seu elevado teor de proteínas e bom desempenho tecnológico, além dos efeitos benéficos à saúde (TANG, 2019). A proteína de soja está disponível em várias formas comerciais, tais como farinha de soja (SF, *soy flour*), concentrado de proteína de soja (SPC, *soy protein concentrate*) e proteína isolada de soja (SPI, *soy protein isolate*), que é a mais disponível comercialmente. A SPI é produzida a partir de SF e possui mais de 90% de proteínas, que são compostas por uma mistura de albuminas e globulinas (TIAN et al., 2018; SONG et al., 2011).

Alginate de sódio é um polissacarídeo natural e linear extraído de algas marrons através de tratamento com soluções aquosas alcalinas (CAZÓN et al., 2017). Devido a sua baixa toxicidade, baixo custo, boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, o alginato é utilizado em diversas áreas para diferentes propósitos, como na indústria biomédica para impressões dentárias e curativos e na indústria alimentícia como agente gelificante, estabilizante e emulsificante. Além disso, também pode ser utilizado como matriz polimérica visando encapsulação de remédios, proteínas, células e DNA, e na elaboração de filmes e coberturas comestíveis (DÁVILA; ÁVILA, 2017; TAVASSOLI-KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; MASOUDPOUR-BEHABADI, 2016).

Estudos de como as forças eletrostáticas de atração e repulsão entre proteínas e polissacarídeos podem afetar as propriedades reológicas e estruturais são de grande interesse da indústria alimentícia e farmacêutica, uma vez que soluções formadas pela mistura desses polímeros possuem enorme potencial industrial, sendo utilizadas, por exemplo, como géis e emulsões no desenvolvimento de novos produtos, como material de parede para microencapsulação, e na elaboração de coberturas e filmes comestíveis (CHAUX-GUTIÉRREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019; PEÑA-CHÁIDEZ et al., 2021; SILVA et al., 2016; ZHAO et al., 2020a). Silva et al. (2016), por exemplo, observaram um

aumento dos valores do módulo elástico (G') com acréscimo de goma alfarroba em soluções de proteína isolada do soro de leite (WPI), que corresponde a um aumento da força do gel, e indicaram a existência de sinergia entre a proteína e o polissacarídeo. Em seguida, os mesmos autores observaram que o acréscimo do polissacarídeo aumentou a resistência mecânica dos filmes biodegradáveis obtidos a partir dessas soluções. Peña-Cháidez et al. (2021) analisaram adição de alginato em soluções de proteína isolada de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e notaram efeito sinérgico quando as concentrações de ALG aumentaram, o que resultou em uma melhor resposta mecânica da mistura em comparação aos géis individuais.

Há vários estudos mostrando que a interação entre proteínas e polissacarídeos pode modificar estrutura e reologia da solução formada (BI et al., 2013; CHAUX-GUTIÉRREZ; PÉREZ-MONTERROZA; MAURO, 2019; PEÑA-CHÁIDEZ et al., 2021). Alguns estudos do efeito da adição de polissacarídeo em soluções de SPI já foram reportados, como de Bi et al. (2018) com adição de κ -carrageenan; de Amado, Silva e Mauro (2020) com acréscimo de pectina de alta metoxilação; Bi et al. (2013) com adição de goma de linhaça; e Zhao et al. (2020a) com adição de vários polissacarídeos (goma konjac, goma gelana e goma curdlana), sendo que todos os estudos observaram uma melhora nas propriedades funcionais da SPI para produção de alimentos. Zhao et al. (2020a) verificaram aumento de G' durante e após a gelificação da SPI com adição de goma konjac ou goma curdlana e concluíram que a incorporação desses polissacarídeos fortaleceu a estrutura do gel, o que pode favorecer o desenvolvimento de novos produtos. No entanto, estudos sobre reologia e características estruturais de misturas SPI-ALG em diferentes pHs ainda são escassos, razão pela qual conduziu-se esse trabalho.

Considerando este contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar soluções elaboradas com SPI e diferentes concentrações de ALG, em diferentes pHs, e avaliar a interação entre os compostos com base no potencial zeta, análise reológica dinâmica, espectroscopia FTIR e microscopia confocal de varredura a laser.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Materiais

Os materiais utilizados para elaboração das soluções foram SPI (teor de proteína de 90,5% em base seca, de cinzas 5,01% e de umidade 6% em base úmida) adquirida da empresa Ecil Ingredientes (São Paulo, Brasil) e ALG (GRINDSTED[®] Alginate FD 175), doada pela

Danisco Brasil Ltda. Cloreto de sódio, fluoreto de sódio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e ácido sulfúrico foram de grau PA da marca Synth (Diadema, Brasil).

2.2.2 Preparação das soluções

2.2.2.1 Solução estoque

Primeiramente foram preparadas soluções estoque de proteína isolada de soja (8%) e de alginato de sódio (3%). Proteína isolada de soja foi dispersa em água destilada (8%, m/m), seguida de adição de hidróxido de sódio a 40% até atingir pH 11, utilizando-se pHmetro da marca Tecnopon (MPA 210, São Paulo, Brasil). A mistura foi aquecida até 65 °C em banho termostático (Simétrica, SI/6Aneis/18L, Brasil) e mantida a essa temperatura por 10 min (AMADO; SILVA; MAURO, 2020). Alginato de sódio foi dissolvido em água destilada (3%, m/m) à temperatura de 70 °C (SHIGEMATSU et al., 2018; BAGHERI; RADI; AMIRI, 2019) em banho termostático (Simétrica, SI/6Aneis/18L, Brasil) até sua total solubilização.

As soluções foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C) e armazenadas em câmara de climatização BOD (BT 71, Biothec, Brasil) sob refrigeração (4 °C) para serem utilizadas posteriormente.

2.2.2.2 Soluções SPI-ALG

A solução de SPI+ALG foi preparada mediante mistura das soluções estoque e NaCl de tal forma que a composição final da solução apresentou sempre conteúdos de 5% m/m de proteína e 20 mM de NaCl (20% m/v) (força iônica definida após avaliação do seu efeito sobre o potencial zeta e a reologia das soluções – Apêndices A e B, respectivamente), enquanto que variou-se o conteúdo de alginato: 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% m/m. Na preparação, após adição da SPI, ALG e NaCl, em quantidades adequadas para formulação desejada, a solução foi submetida a agitação mecânica constante por 3 h em agitador magnético (Simétrica, SI AGMC/A, Brasil). Em seguida corrigiu-se o pH da solução com HCl (5,83 mol/L) (pH 6 e 8) ou NaOH (10 mol/L) (pH 11) e acrescentou-se água destilada até completar a quantidade de solução pretendida, deixando-se em agitação por mais 1 h. Por fim, realizou-se um tratamento térmico elevando-se a temperatura até 70 °C e mantendo-a por mais 20 m (KOKOSZKA et al., 2010; AMADO; SILVA; MAURO, 2020).

2.2.3 Análises em solução

2.2.3.1 Potencial Zeta

O equipamento utilizado foi o Malvern Zetamaster (Zetasizer Nano – ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) e o software para coleta de dados, o Zetasizer v.3.30. Especificamente para essa análise, o cloreto de sódio (NaCl) foi substituído por fluoreto de sódio (NaF) e o ácido clorídrico (HCl) por ácido sulfúrico (H₂SO₄), uma vez que os eletrodos da cubeta, que são revestidos de ouro, poderiam ser oxidados pelo cloro.

Para avaliar as alterações das cargas do SPI e do ALG com a variação do pH, e da mistura SPI+ALG com o pH e a concentração do polissacarídeo em solução, foi utilizada uma diluição de 1:100 em água deionizada, em que foi mantida a concentração do sal monovalente utilizado. As soluções foram armazenadas em balões volumétricos e imediatamente antes das medidas foram agitadas manualmente. Os resultados foram obtidos em milivolt (mV), em triplicata.

2.2.3.2 Propriedades reológicas

Ensaio reológico em cisalhamento oscilatório das soluções dos polissacarídeos puros e das misturas SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1%) foram realizadas em um reômetro AR 2000EX (TA Instruments, Delaware, USA) com geometria de placas paralelas (40 mm diâmetro), utilizando um gap de 500 µm. Amostras foram inseridas no reômetro com auxílio de uma pipeta Pasteur. O sistema ficou em equilíbrio por 2 min para a amostra atingir a temperatura de medição (25 °C). Após o equilíbrio, as medições reológicas foram iniciadas.

O teste foi realizado na região viscoelástica linear (LVR), a qual foi determinada previamente para todas as amostras através de um teste de varredura crescente de deformação, na faixa de 0,001 a 1 utilizando as frequências 0,5 e 5 rad·s⁻¹. Todas as subseqüentes varreduras de frequência foram realizadas a 25 °C na faixa de 0,1 a 10 rad·s⁻¹, mantendo a deformação constante (0,02).

Os efeitos da concentração de ALG e do pH foram estudados por meio dos módulos de armazenamento (G') e de dissipação de energia (G''). Todas as análises foram realizadas em duplicata, e quando necessário foi realizada repetição.

O modelo da Lei da Potência foi usado para descrever a dependência dos módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') com a frequência, de acordo com as Equações 2.1 e 2.2 (RAO, 2007).

$$G' = A' \omega^{n'} \quad (2.1)$$

$$G'' = A'' \omega^{n''} \quad (2.2)$$

em que A é a constante relacionada à força do gel, n é o índice de comportamento do escoamento e ω é a frequência angular. Os valores n' e n'' representam uma medida da dependência dos módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') com a frequência e fornecem informações sobre a natureza viscoelástica do material.

2.2.3.3 FTIR-ATR

Análises de infravermelho foram realizadas através da técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando-se Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), marca Bruker (Germany), modelo Vertex 70. O acessório de ATR possui cristal de diamante e foram tomados 32 espectros com resolução de 4 cm^{-1} de cada amostra. Para esta análise as amostras foram obtidas conforme item 2.2.2, em seguida foram secas a 35°C na forma de filmes, por aproximadamente 24 h e, previamente à análise, foram armazenadas em dessecadores com sílica gel por 7 dias a temperatura ambiente.

2.2.3.4 Microscopia confocal de varredura a laser

As micrografias da mistura SPI+ALG foram coletadas usando um microscópio confocal de varredura a laser LEICA TCS SP5 II e uma fonte de laser ótico de hélio neon (Leica Microsystems CMS GmbH, Germany). O comprimento de onda de 543 nm foi usado para a excitação da amostra e a detecção foi realizada na faixa de 560 a 620 nm. As imagens foram adquiridas com uma objetiva de 40×. A proteína nas amostras foi tingida com Rodamina B. O corante foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, 1 mg/mL) e adicionado na proporção de 50 $\mu\text{L/g}$ de solução. As áreas com cor vermelha nas imagens representam as regiões enriquecidas com SPI, e a região escura corresponde à zona rica em ALG.

2.2.4 Análises estatísticas

Os dados dos parâmetros ajustados pela Lei da Potência (RAO, 2007) foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente por análise de variância. O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas entre as amostras ao nível de significância de 5%.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Potencial zeta

A varredura das soluções puras de SPI (5%) e ALG (1%), assim como as misturas de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75; 1%), realizada em uma ampla faixa de pH (2 a 11), estão apresentadas na Figura 2.1, sendo que a Figura 2.1a corresponde às soluções puras (SPI e ALG) e a Figura 2.1b soluções de SPI com adição de ALG nas diferentes concentrações mencionadas. A diluição utilizada foi de 1:100, ressaltando-se que as diluições foram realizadas com soluções salinas na mesma força iônica (20 mM).

Diferentes fatores podem afetar o potencial zeta das soluções, dentre os quais estão a força iônica, estado de desnaturação da proteína, pH e concentração dos polímeros do meio no qual as partículas estão dispersas. No presente trabalho fixou-se o aquecimento das soluções e a força iônica, após testes apresentados no Apêndice A, e avaliou-se a variação do pH e da concentração do polissacarídeo. Em relação à força iônica, espera-se uma redução do potencial zeta com o aumento da concentração do sal, devido à compressão da dupla camada de cargas sobre a superfície do coloide, onde é realizada a medida do potencial zeta. Amado, Silva e Mauro (2020) avaliaram soluções de SPI nas mesmas condições de solubilização e maior força iônica (50 mM) e obtiveram menores valores de potencial zeta na faixa de pH de 3 a 6 e menor pH de reversão de cargas, evidenciando a referida influência da força iônica.

Na Figura 2.1a nota-se que o pH correspondente à reversão de cargas da SPI, que se estabeleceu próximo a 5 e que, abaixo desse pH, há uma região onde os biopolímeros apresentam cargas opostas. Tal situação favorece a interação eletrostática entre a SPI e o ALG. Quando o pH é igual ou maior a 5, constata-se que a região é de repulsão, uma vez que ambos os polímeros carregam uma carga líquida negativa, favorecendo as forças eletrostáticas repulsivas, e uma separação de fases segregativa é esperada.

Com respeito ao ALG (Figura 2.1a) nota-se que este apresenta cargas negativas em toda faixa de pH analisada, como esperado, uma vez que o alginato é considerado um polissacarídeo aniônico, e o valor de pKa se estabeleceu próximo a 2,0. Nota-se também que para pHs mais ácidos (pH<3,5), a magnitude de cargas superficiais é perceptivelmente inferior. Su et al. (2019) avaliaram o potencial zeta de solução de alginato e também relataram que a intensidade das cargas superficiais diminuiu à medida que a solução se torna mais ácida. Os autores atribuíram tal fato à influência do pH no estado de ionização dos grupos ácido carboxílicos ($-\text{COOH} \leftrightarrow -\text{COO}^-$) para grupos de ácido manurônicos e gulurônicos das moléculas de alginato, uma vez

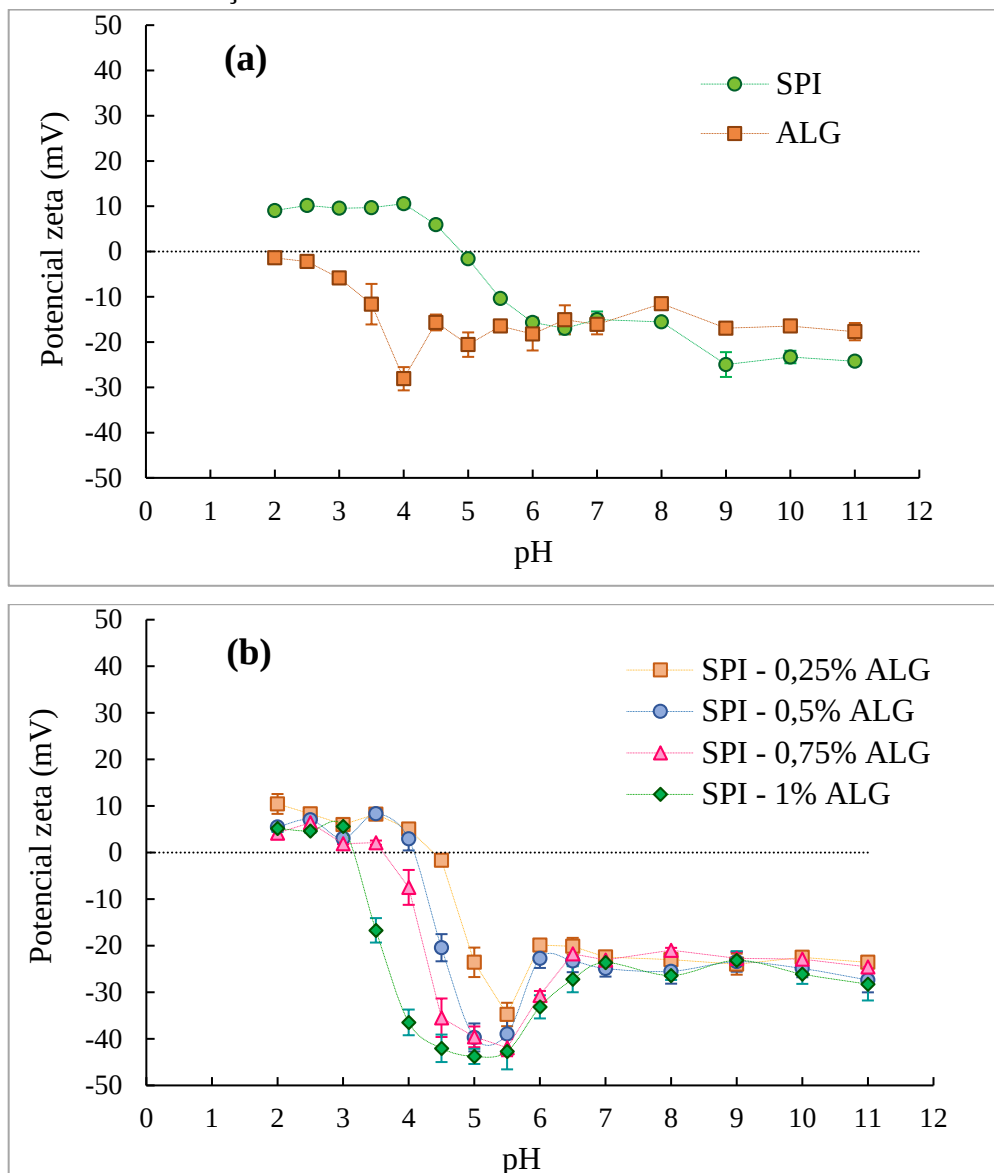
que a constante de dissociação (pK_a) dos grupos ácidos carboxílicos fica em torno de 3,5, indicando que eles começam a perder sua carga em valores iguais ou abaixo desse pH.

Em relação às misturas (Figura 2.1b), verificou-se que a interação máxima entre a SPI e o ALG foi alcançada entre os pHs de 3 a 4,5, dependendo da concentração de ALG. Nota-se que, conforme o ALG é adicionado na solução, o pH de coacervação (pH de máxima interação, que corresponde ao pH de carga líquida igual a zero) é reduzido. Neste pH, a SPI comporta-se como um polycation e interage eletrostaticamente com o alginato, poliânion.

No geral, conforme aumenta-se a concentração de ALG na solução de SPI (5%), há um aumento das cargas negativas. Resultados similares, do aumento das cargas negativas com adição de polissacarídeo aniônico em soluções de proteína foram reportados por Porta et al. (2016), com adição de pectina de baixa metoxilação (PEC) em solução de proteína da ervilha, e por Zhang et al. (2016) com acréscimo de alginato em solução de proteína isolada do soro de leite (WPI). No entanto, nas faixas de pHs de 2 a 3 e de 7 a 11, as soluções nas diferentes concentrações de ALG apresentaram valor de carga superficial semelhante. Além disso, na faixa de pH que vai de 7 a 11, as cargas negativas foram semelhantes e com magnitude da carga da proteína pura, o que pode ser atribuído à maior influência da SPI, cuja concentração utilizada na solução (5%) foi bem superior às concentrações utilizadas de ALG (máximo 1%).

Pelas Figuras 2.1a e 2.1b foi possível identificar as zonas de maior interação e de repulsão entre os biopolímeros, e com o intuito de avaliar a zona de repulsão de cargas, selecionou-se os pHs 6, 8 e 11 para análises reológicas, FTIR e microscopia confocal.

Figura 2.1 – Potencial zeta em função do pH, (a) solução de SPI e ALG e (b) solução SPI-ALG com diferentes concentrações de ALG.



Fonte: Elaborado pelo autor

2.3.2 Análises reológicas

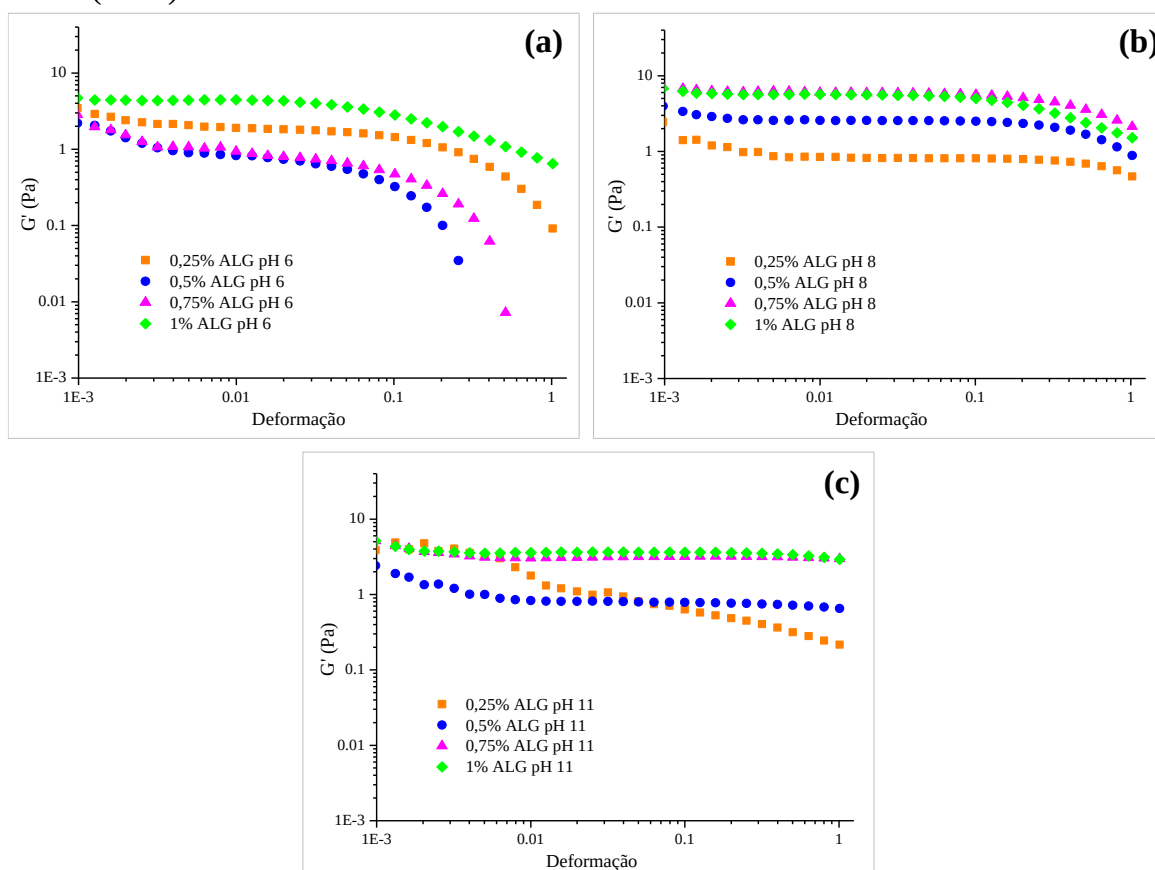
2.3.2.1 Varredura de deformação

A região de viscoelasticidade linear para o sistema SPI (5%) e ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) foi avaliada através de testes nas deformações de 0,001 à 10 e diferentes frequência. Na Figura 2.2 estão apresentados os resultados obtidos em $5 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$. Soluções formadas apenas por SPI (5%), nos três pHs estudados (6, 8 e 11), não apresentaram região de viscoelasticidade linear (RVL), o que impossibilitou a análise oscilatória para essas amostras. Considerando a

RVL para soluções com adição de ALG, no pH 6 (Figura 2.2a), pH 8 (Figura 2.2b) e pH 11 (Figura 2.2c), adotou-se a deformação de 2% para determinação dos espectros mecânicos.

A respeito da deformação crítica nota-se que para soluções no pH 6, esta foi baixa, principalmente para as concentrações 0,5% e 0,75% de ALG. Comparando as soluções no pH 6 o maior valor de deformação crítica foi encontrado para solução 0,25% de ALG. Para soluções no pH 8 o menor valor foi para 1% de ALG, enquanto o maior, assim como no pH 6, foi para solução com acréscimo de 0,25% de ALG. Ao contrário dos outros pHs, no pH 11 a solução 0,25% de ALG apresentou curta faixa de linearidade, e baixo valor de deformação crítica. O restante das soluções, no pH 11, entretanto, apresentaram larga faixa de linearidade, e a deformação crítica ficou acima da faixa analisada, ou seja, acima da deformação de 1. Sabendo-se que uma redução da deformação crítica pode indicar aumento da heterogeneidade da rede do gel (STADING, HERMANSSON, 1990; CHAUX-GUTIERREZ, PÉREZ-MONTERROZA, MAURO, 2019), os resultados apresentados indicam que as soluções 0,5% e 0,75% ALG no pH 6 e a solução 0,25% ALG no pH 11 podem apresentar essa característica.

Figura 2.2 – Região de viscoelasticidade linear para blends de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c) na frequência de $5 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura ambiente (25°C).



Fonte: Elaborado pelo autor

2.3.2.2 Varredura de Frequência

Quando biopolímeros são misturados, as propriedades mecânicas da solução podem ser modificadas quando comparadas a soluções de proteínas ou polissacarídeos separados. Sabe-se que, as forças eletrostáticas de atração ou repulsão entre proteínas e polissacarídeos correspondem a uma das possibilidades de interações entre esses biopolímeros que mudam as propriedades reológicas (aumentam ou diminuem o G') e alteram também propriedades físico-químicas dos produtos formados a partir deles (CHAUX-GUTIERREZ, PÉREZ-MONTERROZA, MAURO, 2019).

Na Figura 2.3 estão apresentadas as variações do G' e G'' com a frequência angular, para soluções de SPI (5%) com adição de ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (Figura 2.3a), pH 8 (Figura 2.3b) e no pH 11 (Figura 2.3c).

Comportamentos diferentes podem ser verificados para os três pHs analisados, no entanto, para as concentrações de 0,25 a 0,75 % de ALG nota-se que aumentando a concentração do polissacarídeo há uma tendência de aumento do G' , indicando aumento do comportamento viscoelástico. Tendência semelhante foi verificada por Derkach et al. (2015) com géis mistos de gelatina/ κ -carragena, por Tang et al. (2019), em sistemas mistos de caseína/ κ -carragena, e com adição de microfibras de quitina a géis de proteína de soja (YUAN et al., 2014).

No pH 6 (Figura 2.3a) pode-se observar que nas concentrações de 0,25; 0,5 e 0,75% de ALG $G' > G''$ e, conforme o ALG é adicionado, G' tende a aumentar. Aumento dos valores de G' correspondem a um aumento da força do gel e indicam a existência de sinergia entre a proteína e o polissacarídeo (SILVA et al., 2016). Mesmo comportamento foi relatado por Silva et al. (2016) para acréscimos de até 0,3% LBG em géis de WPI e por Rocha et al. (2009) com acréscimo de pequenas quantidades de LBG a géis de proteína concentrada do soro de leite (WPC). No pH 8 (Figura 2.3b) o mesmo comportamento do pH 6 foi verificado. No entanto, as diferenças entre G' e G'' são mais visíveis em baixas frequências. Além disso, os valores de G' e G'' são inferiores aos encontrados em pH 6.

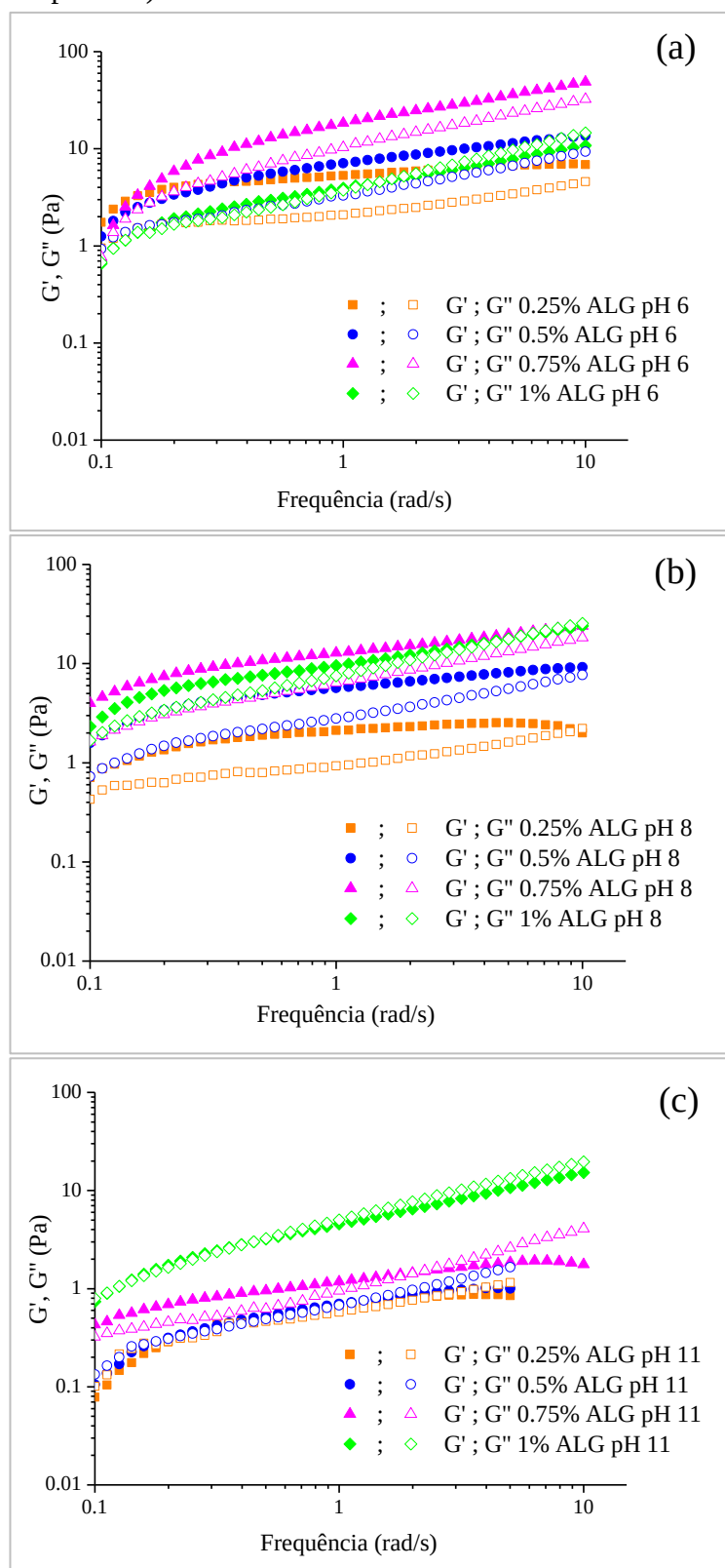
Para concentração 1% de ALG, tanto no pH 6 quanto no pH 8, verifica-se que não ocorreu o mesmo comportamento. Pode-se notar que a gelificação foi prejudicada, provavelmente devido ao tipo de interação, que tende a agregar os dois polímeros em pHs mais próximos da coacervação. Por essa razão, essa queda está mais evidenciada no pH 6, enquanto no pH 8 essa queda foi menor, possivelmente devido à maior solubilidade da SPI nesse pH. Além disso, destaca-se que os valores de G' e G'' obtidos no pH 8, exceto para formulação 0,25% ALG, foram os maiores entre os pHs analisados. G' e G'' também são muito próximos

e apresentam sobreposições e cruzamentos. Nos pHs 6 e 8, os cruzamentos de G' e G'' ocorrem na concentração de 1% ALG, o que pode indicar que nessa concentração há comportamento de solução concentrada.

Nota-se que o comportamento de G' depende das concentrações de biopolímeros utilizadas no preparo do gel. Chaux-Gutierrez, Pérez-Monterroza e Mauro (2019) elaboraram géis de albumina (ALB) e pectina (PEC) e verificaram que 2% de PEC corresponde à concentração crítica na mistura, sendo que acima de 2% de PEC houve uma queda do G' , assim como ocorreu no presente trabalho para maior concentração de ALG (1%), nos pHs 6 e 8.

No pH 11 (Figura 2.3c) observa-se que as concentrações 0,25 e 0,5% de ALG apresentam comportamento similar ao longo de toda faixa de frequência, o que indica que possuem estruturas semelhantes, e um aumento dos módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') com 0,75 e 1% ALG pode ser verificado. No entanto, exceto para solução 1% ALG, as demais apresentaram baixos valores de G' e G'' , ficando abaixo de 1 para uma ampla faixa de frequência, o que indicaria um gel mais fraco que aqueles formados nos pHs mais baixos. Além disso, nesse pH, houve cruzamento de G'' com G' , com G'' excedendo G' , o que indica transição da zona de platô para zona de transição, no qual o gel passa a ter comportamento viscoso (HSIEH et al., 1999).

Figura 2.3 – Variação de G' e G'' com a frequência angular para blendas de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c) (Símbolos preenchidos para G' e símbolos vazios para G'').



Fonte: Elaborado pelo autor

Os parâmetros da Lei da Potência para as amostras de SPI-ALG nas diferentes concentrações de ALG e pHs estão apresentados na Tabela 2.1.

Quanto ao ajuste, exceto para soluções 0,25 %ALG pH 8, o coeficiente de determinação (R^2) ficou acima de 0,88, indicando bons ajustes.

A magnitude de A' aumentou com o acréscimo de ALG até 0,75% nos pHs 6 e 8, decrescendo com 1% de ALG. No pH 11 o valor de A aumentou com adição de ALG até 1%, sendo esse valor significativamente maior ($p < 0,05$) que nas demais concentrações de ALG nesse mesmo pH. Quanto ao A'' , para o pH 6 verificou-se o mesmo comportamento, enquanto o pH 8 apresentou aumento conforme o ALG foi sendo adicionado, assim como ocorreu no pH 11. Sabendo-se que quanto maior o valor de A , geralmente mais fortes são os géis formados, podendo-se inferir que géis com 0,75% ALG, nos pHs 6 e 8, apresentam maior força do gel entre as composições avaliadas.

Em relação aos índices de comportamento, nota-se que, exceto para formulação 0,75%ALG, a adição de ALG elevou os valores de n' e n'' , indicando maior dependência dos módulos G' e G'' com a frequência.

Tabela 2.1 – Parâmetros do ajuste do modelo da Lei da Potência para G' e G'' nas soluções SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG em diferentes pHs, força iônica de 20 mM, e temperatura ambiente (25°C).

Formulação	pH	A' (Pa·s ⁿ)	n' (-)	R^2	A'' (Pa·s ⁿ)	n'' (-)	R^2
0,25%ALG	6	5,10 ± 1,31 ^a	0,16 ± 0,03 ^b	0,888	2,24 ± 0,54 ^b	0,27 ± 0,03 ^c	0,954
0,5%ALG		6,58 ± 4,53 ^a	0,33 ± 0,03 ^{ab}	0,966	3,32 ± 2,08 ^{ab}	0,44 ± 0,00 ^b	0,995
0,75%ALG		16,88 ± 3,85 ^a	0,46 ± 0,08 ^a	0,981	9,94 ± 2,70 ^a	0,52 ± 0,03 ^{ab}	0,993
1%ALG		3,82 ± 2,15 ^a	0,46 ± 0,04 ^a	0,994	3,76 ± 1,43 ^{ab}	0,59 ± 0,03 ^a	0,999
0,25%ALG	8	1,92 ± 0,90 ^b	0,14 ± 0,05 ^c	0,635	0,98 ± 0,44 ^b	0,32 ± 0,05 ^b	0,979
0,5%ALG		5,38 ± 0,17 ^{ab}	0,26 ± 0,02 ^{bc}	0,959	2,80 ± 0,15 ^{ab}	0,43 ± 0,02 ^{ab}	0,996
0,75%ALG		12,33 ± 0,58 ^a	0,30 ± 0,01 ^{ab}	0,985	6,33 ± 0,25 ^{ab}	0,46 ± 0,00 ^a	0,999
1%ALG		9,51 ± 3,35 ^a	0,39 ± 0,02 ^a	0,994	7,60 ± 2,70 ^a	0,53 ± 0,01 ^a	0,999
0,25%ALG	11	0,58 ± 0,31 ^b	0,33 ± 0,04 ^b	0,879	0,58 ± 0,20 ^b	0,42 ± 0,01 ^c	0,973
0,5%ALG		0,64 ± 0,09 ^b	0,37 ± 0,02 ^b	0,940	0,68 ± 0,11 ^b	0,54 ± 0,01 ^b	0,997
0,75%ALG		1,14 ± 0,10 ^b	0,27 ± 0,03 ^b	0,953	0,96 ± 0,07 ^b	0,62 ± 0,02 ^a	0,996
1%ALG		4,45 ± 0,40 ^a	0,54 ± 0,04 ^a	0,998	4,98 ± 0,73 ^a	0,61 ± 0,00 ^a	0,999

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

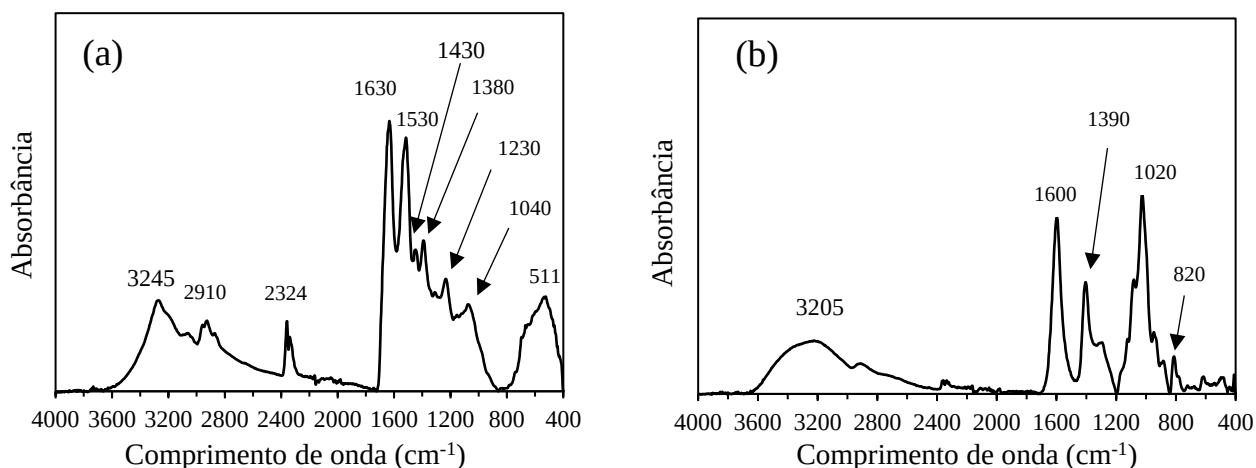
**a,b,c,d Letras minúsculas diferentes na mesma coluna no mesmo pH indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

2.3.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A Figura 2.4 apresenta os espectros de infravermelho dos pós de SPI (Figura 2.4a) e ALG (Figura 2.4b). Nota-se que a SPI pura exibe vibrações típicas de proteína, apresentando um pico em aproximadamente 1630 cm^{-1} que corresponde ao grupamento amida I (estiramento C=O), um segundo em aproximadamente 1530 cm^{-1} , que corresponde ao grupamento amida II (dobramento N-H) e um terceiro em torno de 1230 cm^{-1} , que corresponde à banda de amida III (estiramento C-H e N-H) (GARRIDO et al., 2016; LI et al., 2016). Além desses, a SPI também apresentou picos próximos a 3245 cm^{-1} , 2910 cm^{-1} , 2324 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} e 511 cm^{-1} .

O ALG, por sua vez, apresentou um pico relacionado ao grupo carboxílico, próximo a 1600 cm^{-1} (YAO et al., 1996), além de bandas em 820 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 1390 cm^{-1} e 3205 cm^{-1} . A banda entre 3000 e 3500 cm^{-1} , encontrada para ambos os biopolímeros, pode ser associada com o estiramento O-H, o que indica um elevado potencial para interações de hidrogênio intermoleculares entre grupos hidroxilas, bem como entre grupos hidroxila e grupos amino (GARRIDO et al., 2016).

Figura 2.4 – Espectros FTIR do pó de SPI (a) e do pó de ALG (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 2.5 estão apresentados os espectros das amostras das misturas, preparadas na forma de filmes a partir das soluções de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%). As misturas foram elaboradas no pH 6 (Figura 2.5a), pH 8 (Figura 2.5b) e pH 11 (Figura 2.5c). Nos três pHs estudados observa-se que a adição de ALG à solução de SPI provocou mudanças estruturais, levando a alterações no posicionamento e intensidade dos picos.

No pH 6 (Figura 2.5a) nota-se o desaparecimento do pico próximo a 980 cm^{-1} com acréscimo de apenas 0,25%ALG e redução da intensidade do pico em 1430 cm^{-1} a partir da concentração de 0,5% ALG. Além disso ocorre o deslocamento da banda próxima a 1100 cm^{-1} e o aparecimento de um pico próximo a 1074 cm^{-1} com acréscimo de 0,75 e 1%ALG.

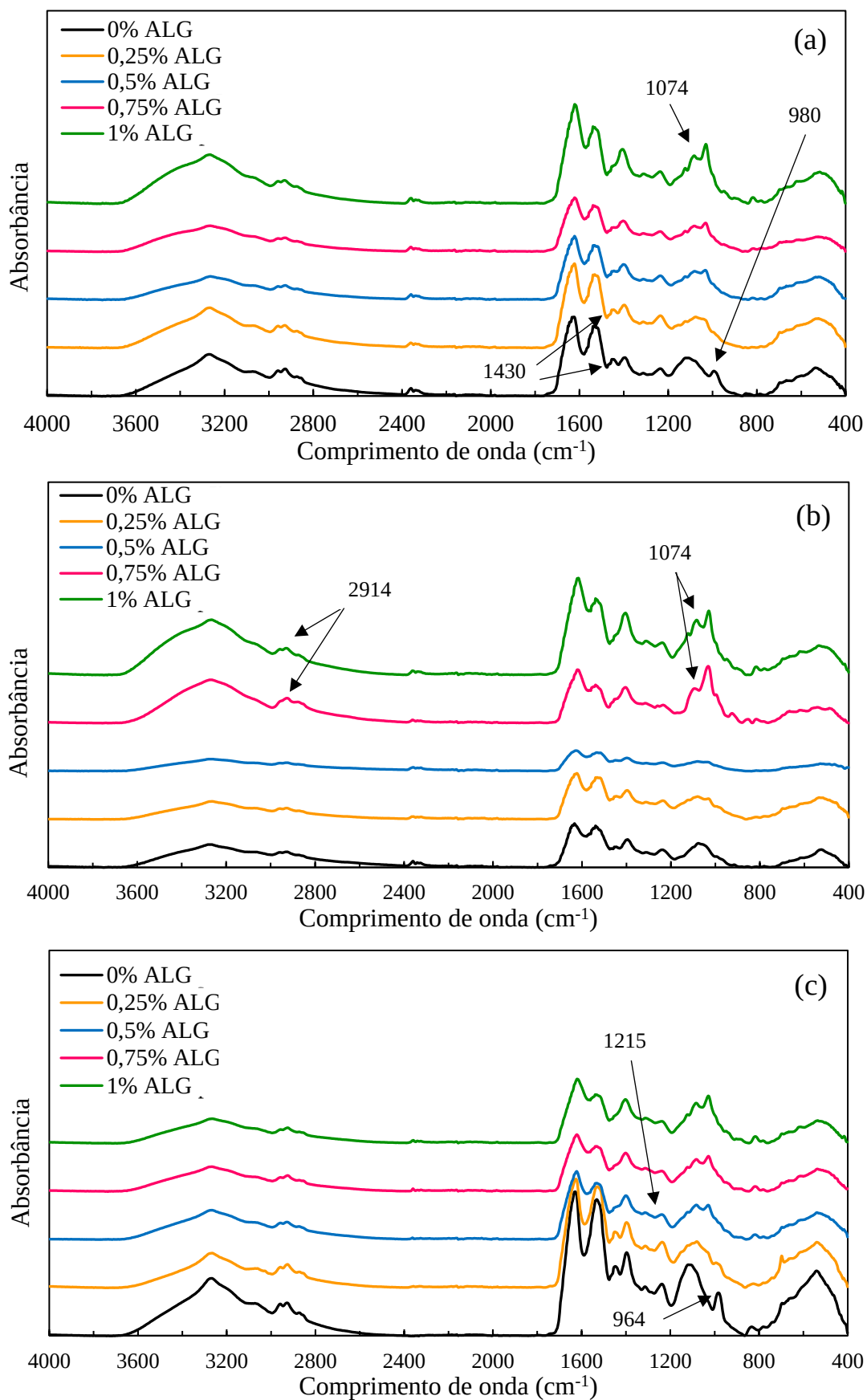
O desaparecimento do pico próximos a 980 cm^{-1} com o acréscimo de ALG, possivelmente devido a um deslocamento, pode indicar que ocorreram interações entre o SPI e o polissacarídeo nesse pH. Garrido et al. (2016), ao acrescentarem ágar em filmes de proteína de soja, observaram que picos em 930 e 890 cm^{-1} , relacionados ao ágar puro, desapareceram com a mistura, concluindo que interações entre ágar e SPI estariam ocorrendo, assim como ocorreu no presente trabalho.

No pH 8 (Figura 2.5b) pode-se observar picos com baixa intensidade para formulação 0,5%ALG, e nota-se o aparecimento de um pico em 1074 cm^{-1} com adição de 0,75 e 1%ALG. Essa banda, que também aparece no pH 6 a partir de 0,75% ALG pode corresponder a interações de hidrogênio entre moléculas dos biopolímeros (BERGO; SOBRAL, 2007; LI et al., 2016). No geral, no pH 8, os espectros sem ALG e com 0,25%ALG são bem próximos, assim como ocorre para os espectros de 0,75 e 1%ALG, que se apresentam semelhantes.

No pH 11 (Figura 2.5c) os picos em 1577 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} perdem a intensidade com a adição de ALG, indicando possíveis mudanças estruturais que ocorrem através das interações entre proteínas e polissacarídeos. Nota-se também que a adição de pequenas quantidades de ALG (0,25%) leva ao desaparecimento do pico em 964 cm^{-1} . Além disso, verifica-se o desaparecimento das bandas próximas a 1215 e 1465 cm^{-1} a partir do acréscimo de 0,5%ALG.

Para os três pHs avaliados, verifica-se que os picos relacionados a amida I e amida II (próximos a 1630 e 1530 cm^{-1} respectivamente) sofrem alterações quanto à posição e intensidade nas misturas, o que sugere interação entre a proteína e o polissacarídeo aniônico. Sabendo-se que a amida I representa a interação de hidrogênio com o estiramento COO^- e a amida II representa o estiramento C-N combinado com o dobramento NH, o espectro da região carboxil-amônia sugere que houve interações intermoleculares entre $-\text{NH}^{3+}$ da SPI e COO^- do ALG (YAO et al., 1996; GARRIDO et al., 2016), fato que corrobora as alterações de cargas encontradas no potencial zeta (Figura 2.1), que mostra uma tendência de carga negativa líquida maior para as misturas com mais conteúdo de alginato. Zhao et al. (2020b) analisaram mudanças conformacionais em complexos SPI-polifenol com polissacarídeos aniônicos (Pectina e CMC) e observaram pequenas alterações na posição das bandas relacionadas às amidas citadas, assim como no presente trabalho, e sugeriram a ocorrência de interações entre os polímeros.

Figura 2.5 – Espectros de infravermelho das blends de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c).



Fonte: Elaborado pelo autor

2.3.4 Microscopia confocal

As imagens correspondentes as soluções de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) e diferentes pHs (6, 8 e 11) foram obtidas em um microscópio confocal com uma ampliação de 40× e estão apresentadas na Figura 2.6. As regiões em vermelho e preto indicam a presença de SPI e ALG, respectivamente.

Comparando-se as soluções somente de proteína nos diferentes pHs, em pH 6 (Figura 2.6a1), verifica-se uma estrutura heterogênea e porosa, com certa granulosidade e a presença de grandes partículas de SPI (setas), o que não ocorre em pHs maiores (pHs 8 e 11, Figuras 2.6a2 e 2.6a3), onde a estrutura é densa, homogênea e se espalha por toda a área, com algumas partículas muito pequenas (setas). A estrutura observada na Figura 2.6a1 provavelmente se deve à baixa solubilidade da SPI em pHs próximos ao ponto isoelétrico da proteína (Figura 2.1a), que aumenta conforme o pH cresce (FREITAS; ALBANO; TELIS, 2017).

Em relação à adição de polissacarídeo, na Figura 2.6 é possível observar a separação de fases em todas as condições de pH e concentrações de ALG. Esse comportamento bifásico é consistente com o fato de que a maioria dos sistemas compostos por proteína/polissacarídeo apresentam incompatibilidade termodinâmica com separação de fase segregativa, e cada fase fica enriquecida em um dos biopolímeros (SILVA et al. 2016).

As micrografias indicam que, conforme o alginato é acrescentado, alguns espaços parecem ser preenchidos com o polissacarídeo, formando uma estrutura com maiores concentrações de ALG. No entanto, o comportamento difere bastante em função do pH do meio. Analisando-se as diferentes concentrações de ALG no pH 6 (Figuras 2.6a1 a 2.6e1), nota-se que conforme a concentração de ALG cresce, há uma redução da quantidade e do tamanho das partículas de SPI insolúvel, que também se tornam mais vívidas. Ao mesmo tempo, a rede proteica se destaca devido à agregação da proteína, no meio da qual distinguem-se espaços escuros preenchidos pelo polissacarídeo. Com isso, nesse pH, a adição de ALG parece tornar a distribuição da proteína mais homogênea e a rede proteica parece ocupar menor volume, fato que também foi verificado por Zhao et al. (2020a), com adição de alguns polissacarídeos em géis de SPI, como goma konjac e goma curdlana. A separação de fases segregativa pode ter facilitado a aproximação das proteínas pelo efeito do volume excluído (TOLSTOGUZOV, 1995), propiciando a reticulação da rede proteica nesse pH.

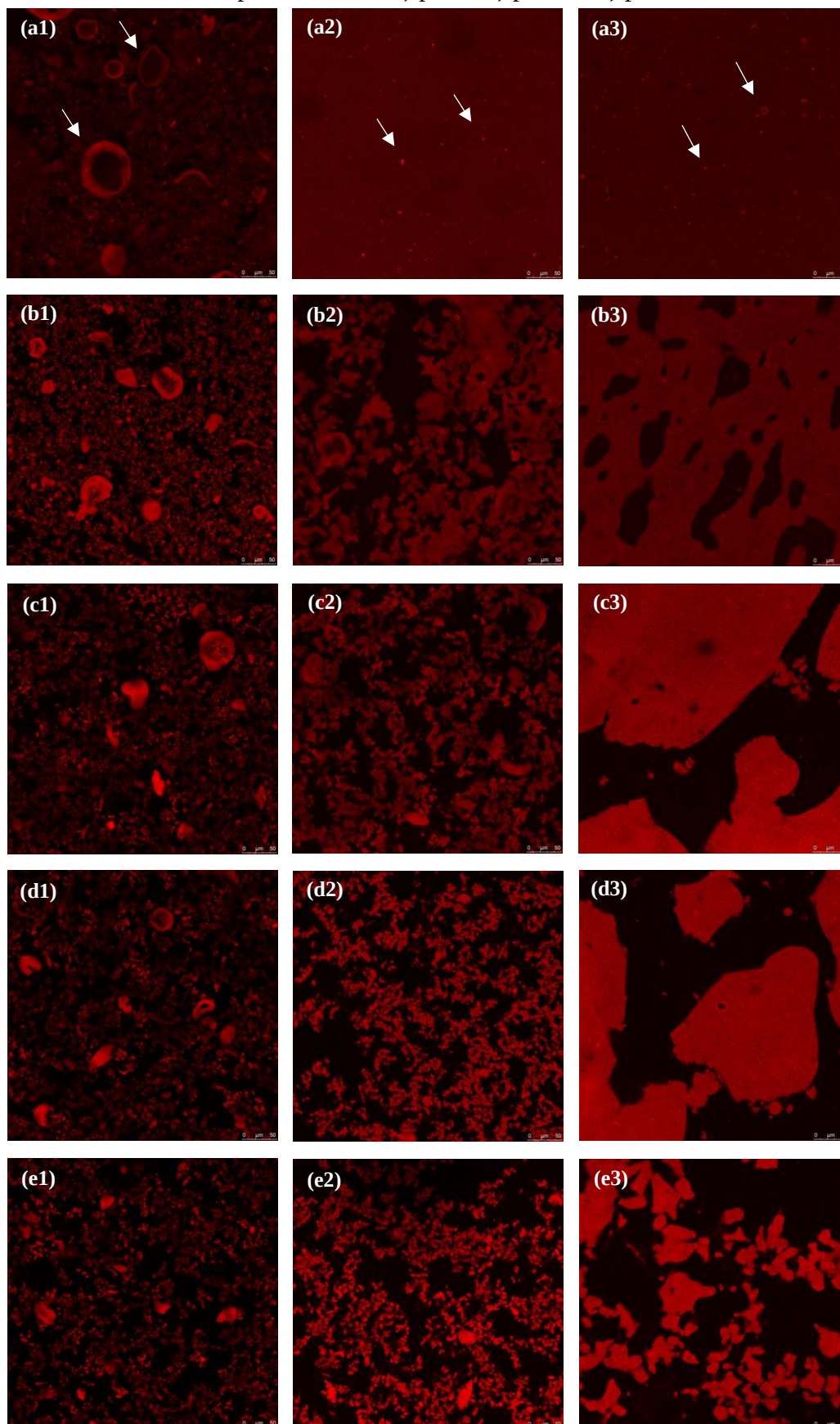
Em relação ao pH 8 (Figuras 2.6a2 a 2.6e2) nota-se que com a adição de 0,25% de ALG há uma visível separação de fases com certa agregação da proteína, cuja distribuição é pouco homogênea, formando grandes espaços preenchidos pelo polissacarídeo. No entanto, em

concentração igual ou maior do que 0,5%, o polissacarídeo se dispersa no meio de forma mais distribuída, preenchendo os espaços livres da rede de SPI, e com o aumento de sua concentração para 0,75% e 1%, o agregado de proteínas se concentra, tornando-se mais vívido e menor, provavelmente devido ao efeito do volume excluído.

No pH 11 (Figura 2.6a3 a 2.6e3) verifica-se que, com a adição do polissacarídeo, em geral, o aspecto das imagens é bem diverso daquelas em pHs menores. Na solução com 0,25% de ALG, o aspecto da fase de SPI é muito similar ao da solução sem o polissacarídeo, porém, com a cor um pouco mais vívida. Visualizam-se grandes espaços escuros, onde o polissacarídeo se distribui, mas a fase proteica mantém o aspecto homogêneo, sem poros ou granulosidade da solução com apenas proteína, e nessa concentração essa fase está totalmente interconectada. Com 0,5% e 0,75%, a separação de fases é mais intensa, onde o polissacarídeo ocupa grandes áreas contínuas, assim como a SPI. Por outro lado, a proteína está mais aglomerada, o que se constata pela densidade e vivacidade da imagem dessas áreas. Com 1% de ALG, no entanto, o comportamento da mistura altera-se, uma vez que a SPI se torna mais dispersa no meio. A imagem das áreas ocupadas pela proteína guarda alguma semelhança com aquela da Figura 2.6b2 (solução em pH 8 com 0,25% de ALG), porém, com densidade e vivacidade bem superior, indicando maior concentração nessa fase proteica, possivelmente pelo efeito do volume excluído. Na condição de pH 11, o aspecto das fases proteicas sugere que as moléculas de proteína estão bem estendidas devido ao desdobramento resultante de sua desnaturação, e que as interações entre diferentes cadeias de proteína propiciam uma estrutura de rede que se manteve mesmo em presença do alginato, nas concentrações estudadas.

Os géis mais fracos foram encontrados em pH 11, o que foi constatado pelos gráficos de varredura de frequência (Figura 2.3). Entretanto, na concentração com 1% de ALG, houve um aumento na força do gel, o que poderia estar relacionado a uma maior dispersão da fase proteica, como observado na Figura 2.6e3.

Figura 2.6 – Imagens da microscopia confocal a laser das soluções de SPI (5%): (a) a (e) 0; 0,25; 0,5; 0,75; e 1% ALG, respectivamente; 1) pH 6; 2) pH 8; e 3) pH 11.



Fonte: Elaborado pelo autor

2.4 Conclusões

Análises de potencial zeta demonstraram que o pH e a razão proteína/polissacarídeo afetaram as cargas dos biopolímeros nas dispersões. Em relação as análises reológicas, estas indicaram que houve consideráveis alterações na estrutura do gel com a variação do pH (6, 8 e 11) e com as diferentes concentrações de ALG. As soluções com adição de 0,75%ALG, nos pHs 6 e 8 apresentaram os maiores valores do parâmetro A da lei da potência, indicando maior força do gel. A partir dos espectros de FTIR e microscopia confocal pode-se confirmar que o pH e a adição do polissacarídeo promoveram mudanças estruturais na mistura SPI-ALG.

Os resultados desse estudo proporcionaram uma melhor compreensão da interação da SPI com ALG em diferentes pHs e concentrações do polissacarídeo, e permitem considerar essa mistura como uma alternativa no preparo de blendas com características reológicas e estruturais específicas.

REFERÊNCIAS

- AMADO, L. R.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Effects of interactions between soy protein isolate and pectin on properties of soy protein-based films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, p. 48732 (1-9), 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.48732>.
- ALBANO, K. M., CAVALLIERI, Â. L. F., NICOLETTI, V. R. Electrostatic interaction between proteins and polysaccharides: Physicochemical aspects and applications in emulsion stabilization. **Food Reviews International**, v. 35, n. 1, p. 54–89, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1467442>.
- ALBANO, K. M., NICOLETTI, V. R. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 41, p. 562–571, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.018>.
- BAGHERI, F., RADI, M., AMIRI, S. Drying conditions highly influence the characteristics of glycerol-plasticized alginate films. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 162-171, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.001>.
- BENETTI, J. V. M.; SILVA, J. T. P.; NICOLETTI, V. R. SPI microgels applied to Pickering stabilization of O/W emulsions by ultrasound and high-pressure homogenization: rheology and spray drying. **Food Research International**, v. 122, p. 383–391, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.020>.
- BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1285-1289, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.014>.

BI, C., LI, D., WANG, L., WANG, Y., ADHIKARI, B. Characterization of non-linear rheological behavior of SPI–FG dispersions using LAOS tests and FT rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1151-1158, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.067>.

BI, C., ZHU, Y, LI, L., ZHANG, Y., HUA, Z., ZHU, J., LIU, Y., LIU, Y, & HUANG, Z. Rheological properties and microstructure of soy protein isolate/ κ -carrageenan gels under high-speed shear treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 236, p. 44-50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.006>.

CAZÓN, P., VELAZQUEZ, G., RAMÍREZ, J. A., VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>.

CHAUX-GUTIÉRREZ, A. M., PÉREZ-MONTERROZA, E. J., MAURO, M. A. Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 60–68, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.025>.

DÁVILA, J. L., D'ÁVILA, M. A. Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1–8, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.057>.

DERKACH, S. R., ILYIN, S. O., MAKLAKOVA, A. A., KULICHIKHIN, V. G., MALKIN, A. Y. The rheology of gelatin hydrogels modified by κ -carrageenan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 612-619, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.024>.

DING, L., HUANG, Y., CAI, X., WANG, S. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 133–141, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.015>.

FREITAS, M. L. F., ALBANO, K. M., TELIS, V. R. N. Characterization of biopolymers and soy protein isolate-high-methoxyl pectin complex. **Polímeros**, v. 27, p. 62-67, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.2404>.

GARRIDO, T., ETXABIDE, A., GUERRERO, P., DE LA CABA, K. Characterization of agar/soy protein biocomposite films: Effect of agar on the extruded pellets and compression moulded films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 408-416, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.089>.

HSIEH, T.; TIU, C. SIMON, G. P.; WU, R. Y. Rheology and miscibility of thermotropic liquid crystalline polymer blends. **Journal of Non Newtonian Fluid Mechanics**, v. 86, p. 15-35, 1999.

KOKOSZKA, S., DEBEAUFORT, F., HAMBLETON, A., LENART, A., VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 3, p. 503-510, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.006>.

LIN, D.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Formation and creaming stability of alginate/micro-gel particle-induced gel-like emulsions stabilized by soy protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 121, p. 107040, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107040>.

LI, Y., CHEN, H., DONG, Y., LI, K., LI, L., LI, J. Carbon nanoparticles/soy protein isolate bio-films with excellent mechanical and water barrier properties. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 133-140, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.072>.

PAN, H., XU, X., TIAN, Y., JIAO, A., JIANG, B., CHEN, J., JIN, Z. Impact of phase separation of soy protein isolate/sodium alginate-co-blending mixtures on gelation dynamics and gels properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 169–179, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.030>.

PEÑA-CHÁIDEZ, J. E.; ROSAS-FLORES, W.; SALAZAR-MONTOYA, J. A.; MORALES-CONTRERAS, B. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; MORALES-CASTRO, J.; MEDRANO-ROLDÁN, H. Rheological and thermal characterization of pinto saltillo bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates/sodium alginate gels. **LWT - Food Science and Technology**, v. 146, p. 111419, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111419>.

PORTA, R., DI PIERRO, P., SABBAH, M., REGALADO-GONZALES, C., MARINIELLO, L., KADIVAR, M., ARABESTANI, A. Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 245–251, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.07.001>.

RAO, M. A. Flow and functional models for rheological properties of fluid foods. In: RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods**. 2. ed., Geneva, NY: Springer, 2007. p. 27-58.

ROCHA, C., TEIXEIRA, J. A., HILLIOU, L., SAMPAIO, P., & GONÇALVES, M. P. Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1734–1745, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.005>.

SALGIN, S.; SALGIN, U.; BAHADIR, S. Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 12404 – 12414, 2012.

SILVA, K. S., FONSECA, T. M. R., AMADO, L. R.; MAURO, M. A. Physicochemical and microstructural properties of whey protein isolate-based films with addition of pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 122-128, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.005>.

SILVA, K. S., MAURO, M. A., GONÇALVES, M. P., ROCHA, C. M. R. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 179-188, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.028>.

SHIGEMATSU, E.; RODRIGUES, H.; ARAÚJO, S. K.; MAGALHÃES, R. L. Estudo da vida útil de uvas minimamente processadas com cobertura à base de cera de abelha e alginato de sódio. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 12, n. 2, p. 2663-2682, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3895/rbta.v12n2.6869>.

SONG, F., TANG, D. L., WANG, X. L., WANG, Y. Z. Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 10, p. 3369-3380, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm200904x>.

STADING, M., HERMANSSON, A. Viscoelastic behavior of β -lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 2, p. 121-135, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80013-1).

SU, Y., GU, L., ZHANG, Z., CHANG, C., LI, J., MCCLEMENTS, D. J., YANG, Y. Encapsulation and release of egg white protein in alginate microgels: Impact of pH and thermal treatment. **Food Research International**, v. 120, p. 305-311, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.048>.

TANG, C. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review). **Food Hydrocolloids**, v. 91, p. 92-116, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.012>.

TANG, M., ZHU, Y., LI, D., ADHIKARI, B., WANG, L. Rheological, thermal and microstructural properties of casein/ κ -carrageenan mixed systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 113, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108296>.

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; SHEKARCHIZADEH, H.; MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 360-374, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.074>.

TIAN, H., GUO, G., FU, X., YAO, Y., YUAN, L.; XIANG, A. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120, 475-490, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.110>.

TOLSTOGUZOV, V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. **Food Hydrocolloids**, v. 9, n. 4, p. 317-332, 1995.

YAO, K., LIU, J., CHENG, G. X., LU, X. D., TU, H. L., SILVA, J. A. L. Swelling Behavior of Pectin/Chitosan Complex Films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 60, p. 279-283, 1996.

YUAN, Y., SUN, Y., WAN, Z., YANG, X., WU, J., YIN, S., WANG, J., GUO, J. Chitin Microfibers Reinforce Soy Protein Gels Cross-Linked by Transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4434-4442, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf500922n>.

ZHAO, H., CHEN, J., HEMAR, Y., CUI, B. Improvement of the rheological and textural properties of calcium sulfate-induced soy protein isolate gels by the incorporation of different polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 310, 2020a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125983>.

ZHAO, Y., WANG, X., LI, D., TANG, H., YU, D., WANG, L., JIANG, L. Effect of anionic polysaccharides on conformational changes and antioxidant properties of protein-polyphenol binary covalently-linked complexes. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 89-97, 2020b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.021>.

ZHANG, Z., ZHANG, R., ZOU, L., & McCLEMENTS, D. J. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 308-315, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.015>.

Capítulo 3

Efeito da concentração de alginato de sódio e do pH em filmes à base de proteína isolada de soja

3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO E DO pH EM FILMES À BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

RESUMO

O isolado proteico de soja tem sido avaliado com alto potencial para elaboração de embalagens biodegradáveis. No entanto, filmes formados a partir do isolado proteico de soja (SPI) podem ser aprimorados a partir da mistura com outros compostos, como polissacarídeos. Neste estudo filmes à base de SPI (5% m/m solução filmogênica) foram elaborados com diferentes concentrações de alginato de sódio (ALG) (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% m/m de solução filmogênica) nos pHs 6, 8 e 11. As propriedades mecânicas, óticas, umidade, solubilidade, isoterma de sorção e propriedades de barreira (ao vapor de água e oxigênio) dos filmes obtidos a partir de soluções de SPI e SPI-ALG em diferentes pHs foram estudadas e correlacionadas com as propriedades estruturais (FTIR e Raio-X) e com a microestrutura (MEV) dos filmes. A adição de ALG provocou alterações significativas no arranjo estrutural do filme de SPI, evidenciadas principalmente pela MEV mais rugosa e alterações nas intensidades das bandas do FTIR. Observou-se que a resistência dos filmes melhorou com o acréscimo crescente do polissacarídeo, nos três pHs avaliados, e o pH 11 foi o que proporcionou maiores valores de tensão aos filmes de SPI (5%) em todas as concentrações de ALG. De modo geral, a concentração crescente de ALG nos filmes de SPI também aumentou a opacidade e solubilidade dos mesmos. A PVA dos filmes não apresentou mudanças significativas com a adição do ALG e/ou mudança no pH. A permeabilidade ao oxigênio em pH 11 diminuiu de maneira significativa com a incorporação do ALG na matriz do filme, e conforme aumentou-se a concentração do polissacarídeo, os valores foram ainda menores, chegando a uma redução de 132% na formulação com 1% de ALG. Filmes de SPI com adição de ALG apresentaram boas propriedades mecânicas e de barreira, oferecendo particularidades específicas em cada pH, o que possibilita elaboração de filmes e coberturas comestíveis para aplicações específicas.

3.1 Introdução

São crescentes as pesquisas para a substituição de embalagens derivadas do petróleo por embalagens sustentáveis, uma vez que as primeiras, não sendo biodegradáveis, podem provocar graves consequências ao meio ambiente (TIAN et al., 2018). Biopolímeros como proteínas, polissacarídeos e a combinação deles são atualmente utilizados como componentes principais

para a produção de filmes comestíveis, que podem ser utilizados como embalagem primária para alimentos com o intuito principal de proteger e prolongar sua vida útil (COLTELLI et al., 2015; XUE et al., 2019). No desenvolvimento dos filmes, normalmente são utilizados plastificantes (como glicerol ou sorbitol), cujas moléculas, de baixa massa molecular e baixa volatilidade, promovem maior mobilidade da rede polimérica e reduzem a fragilidade dos filmes (KOKOSZKA et al., 2010).

Dentre as proteínas, o isolado proteico de soja (SPI) é considerado uma das alternativas mais atraentes, fato que pode ser atribuído à sua alta disponibilidade e capacidade de formação de filme (XIÃO et al., 2021). Além disso, a proteína de soja possui importantes propriedades nutricionais e funcionais (HAN; YU; WANG, 2018). O SPI é obtido a partir da farinha de soja desengordurada e contém mais de 90% de proteína, composta principalmente de glicina (11S) e conglicinina (7S), que juntas representam cerca de 80% da proteína total de soja (SUN, 2005; TIAN et al., 2018). Quando dissolvidas na água, as proteínas do SPI se dobram formando uma estrutura globular, no entanto, em pHs distantes do seu ponto isoelétrico ($\text{pH} \cong 4,5$), essa estrutura se desdobra parcialmente gerando melhor flexibilidade das cadeias peptídicas e expondo grupos funcionais que possibilitam aumento das interações intermoleculares, como interações de hidrogênio, eletrostáticas ou hidrofóbicas (GUERRERO; DE LA CABA, 2010; KIM; NETRAVALI, 2011; LI et al., 2022). Além disso, sabe-se que a SPI possui muitos grupos laterais reativos, como $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ e $-\text{SH}$, que podem facilmente participar de reações de *crosslinking* (SU et al., 2010).

ALG é um polissacarídeo aniônico não ramificado extraído de várias espécies de algas marrons (*Phaeophyceae*). Quimicamente, é composto por unidades de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) que formam estruturas de blocos homopoliméricos ou heteropoliméricos ao longo das cadeias (CLEMENTI, 1997). ALG possui estabilidade química e sensibilidade ao pH, além da grande vantagem da ausência de toxicidade, o que amplia suas aplicações na indústria de alimentos (PAN et al., 2015; ZHANG et al., 2019).

Filmes puros de proteínas ou polissacarídeos podem apresentar algumas limitações. Os filmes produzidos a partir de polissacarídeos, por exemplo, possuem barreiras menos eficazes contra gases (O_2 e CO_2) e propriedades mecânicas inferiores às aquelas de filmes produzidos a partir de proteínas, o que ocorre devido à estrutura única da proteína (à base de 20 monômeros diferentes) que fornece alto potencial para ligações intermoleculares (KAEWPRACHU; RAWDKUEN, 2014; KOSHY et al., 2015; OU; KWOK; KANG, 2004).

Filmes compostos elaborados com proteína e polissacarídeo podem abrir novas possibilidades e reduzir limitações físicas e químicas de polímeros, otimizando as propriedades

dos filmes comestíveis (BRINDLE; KROCHTA, 2008; OSÉS et al., 2009; SONG; ZHENG, 2014). A interação entre proteína e polissacarídeo, e a otimização de parâmetros como concentração de cada componente e pH podem ser excelentes alternativas para melhorar propriedades funcionais dos filmes. Há na literatura várias pesquisas sobre a interação entre proteína de soja e polissacarídeos, como carboximetilcelulose (OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021), pectina (AMADO; SILVA; MAURO, 2020), ágar (KIM; NETRAVALI, 2012) e goma guar (SUI et al., 2016) para formação de filmes, porém, estudos abordando características de filmes de SPI com adição do ALG ainda são escassos. O acréscimo de um polissacarídeo aniônico, como o ALG, em soluções de proteína, pode permitir a formação de géis compostos com redes interpenetrantes e melhorar propriedades funcionais de filmes elaborados a partir da mistura, como barreira à luz e ao oxigênio e propriedades mecânicas (TURGEON; BEAULIEU, 2001; PEÑA-CHÁIDEZ et al., 2021).

A influência do pH em filmes compostos não tem sido muito explorada, e sabe-se que esta é uma variável que afeta de forma significativa a formação de filmes biodegradáveis (MAURI; ANÓN, 2006). Segundo Mauri e Anón (2006) a formação de filmes de proteína de soja é alcançada somente em pHs 1-3 e 6-12, uma vez que nesses pHs as proteínas desnaturam-se e desdobram-se, expondo grupos sulfidrilas e hidrofóbicos, que se associam durante a formação do filme. Próximo ao ponto isoelétrico (pI) da SPI, que corresponde ao $\text{pH} \cong 4,5$, ela coagula ao invés de se dispersar, não permitindo assim a formação do filme. Sabe-se também que a maioria dos filmes à base de proteínas apresentam melhores propriedades físicas quando processados em condições alcalinas em comparação com aqueles em pHs ácidos (AMADO; SILVA; MAURO, 2020; CAO et al., 2007; CHAE; HEO, 1997; KIM; NETRAVALI, 2011; OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021; KOSHY et al., 2015; ROCHA et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi desenvolver e caracterizar filmes compostos de SPI e ALG, alterando o pH da solução. A influência da adição do polissacarídeo e da variação do pH foi avaliada sobre propriedades estruturais (FTIR, Raio X e microscopia), de barreira (ao vapor de água, ao oxigênio e a luz), propriedades mecânicas, cor, solubilidade e isotermas de sorção.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Materiais

As matérias-primas utilizadas para elaboração das soluções e dos filmes foram o isolado proteico de soja (teor de proteína de 90,5% em base seca, de cinzas 5,01% e de umidade 6% em base úmida) adquirido da empresa Ecil Ingredientes (São Paulo, Brasil) e o alginato de sódio (viscosidade 470 mPa·s) (GRINDSTED[®] Alginate FD 175), doado pela Danisco Brasil Ltda. Utilizou-se também glicerol bidestilado, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico de grau PA da marca Synth (Diadema, Brasil).

3.2.2 Elaboração dos filmes comestíveis

Primeiramente prepararam-se soluções estoque de proteína isolada de soja (8%) e de alginato de sódio (3%). Proteína isolada de soja foi dispersa em água destilada para obtenção de solução com concentração 8% (m/m), seguida de adição de hidróxido de sódio a 40% até atingir pH 11, utilizando-se pHmetro da marca Tecnopon (MPA 210, Brasil). Posteriormente, essa suspensão foi aquecida até 65 °C em banho termostático (Simétrica, SI/6Aneis/18L, Brasil) para dissolução da SPI, sendo mantida a essa temperatura por 10 min (LAM; PAULSEN; CORREDIG, 2008; AMADO; SILVA; MAURO, 2020). Alginato de sódio foi dissolvido em água destilada numa proporção de 3% (m/m) à temperatura de 70 °C (SHIGEMATSU et al., 2018; BAGHERI; RADI; AMIRI, 2019), em banho termostático (Simétrica, SI/6Aneis/18L, Brasil), até sua total solubilização, por ocorreu após aproximadamente 30 min. As soluções foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C) e armazenadas em câmara de climatização BOD (BT 71, Biothec, Brasil) sob refrigeração (4 °C) para serem utilizadas posteriormente.

A solução filmogênica de SPI-ALG foi preparada mediante mistura das soluções estoque, glicerol e NaCl de tal forma que a composição final da solução apresentou sempre conteúdos de 5% (m/m) de proteína, 2% (m/m) de glicerol (SILVA et al., 2016) e 20 mM de NaCl (20% m/v), enquanto que variou-se o conteúdo de alginato: 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% m/m. Na preparação, após adição da SPI, ALG, glicerol e NaCl, em quantidades adequadas para formulação desejada, a solução foi submetida a agitação mecânica constante por 3 h em agitador magnético (Simétrica, SI AGMC/A, Brasil). Em seguida corrigiu-se o pH da solução com HCl (5,83 mol/L) (pH 6 e 8) ou NaOH (10 mol/L) (pH 11) e acrescentou-se água destilada até

completar a quantidade de solução pretendida, deixando-se em agitação por mais 1 h. Por fim, realizou-se um tratamento térmico a 70 °C mantidos por 20 m (KOKOSZKA et al., 2010).

Para elaboração dos filmes, utilizou-se o método *casting*. A solução foi despejada em suportes de polietileno, em quantidades adequadas para obtenção de filmes com espessuras semelhantes, determinadas após testes. A seguir, os filmes foram secos em câmaras de climatização BOD (BT 71, Biothec, Brasil) a 35 °C por 24 h. Vale ressaltar que foram inseridas bandejas com sílica gel dentro das BODs com intuito de reduzir a umidade relativa do ambiente e auxiliar a secagem.

3.2.3 Caracterização dos filmes de SPI e SPI-ALG

Para a caracterização dos filmes foram realizadas análises de espessura, FTIR, raio-X, análise morfológica, propriedades mecânicas e óticas, umidade, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água, isothermas de sorção e permeabilidade ao oxigênio. Com exceção das análises de FT-IR, morfológicas e isothermas, que foram realizadas no filme após armazenamento em presença de sílica, previamente à realização das demais análises os filmes foram mantidos em dessecadores com solução saturada de nitrato de magnésio (UR de 52,9% à temperatura de 25 °C) (GREENSPAN, 1977), por no mínimo 7 dias (ASTM D882-12).

3.2.3.1 Espessura

A análise de espessura dos filmes foi realizada utilizando-se um micrômetro digital (MDC-25SB, Mitutoyo, Japan). As medidas foram tomadas em pelo menos dez diferentes pontos dos filmes, escolhidos aleatoriamente.

3.2.3.2 Análise por Infravermelho de Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Análises de infravermelho foram realizadas através da técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando-se Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Bruker, Vertex 70, Alemanha). O acessório de ATR possui cristal de diamante e foram tomados 32 espectros com resolução de 4 cm⁻¹ de cada amostra, em uma faixa espectral entre 400 e 4000 cm⁻¹.

3.2.3.3 Análises morfológicas

A microestrutura superficial e transversal dos filmes foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente as amostras de filme foram

armazenadas a temperatura ambiente em dessecadores contendo sílica por quinze dias, para remoção da umidade. Previamente à análise, as amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio com fita de carbono e então, recobertas por uma fina camada de ouro, sob vácuo, por 2 min. Por fim, as imagens foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (FEG-MEV JEOL – JSM7500F, Alemanha), operando com uma tensão de aceleração de elétrons de 2 kV.

3.2.3.4 Difração de Raios-X e cristalinidade relativa

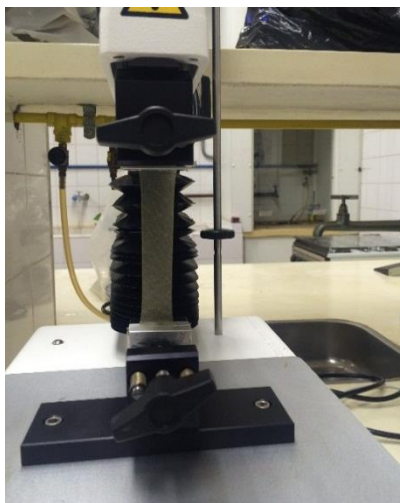
A análise de Difração de Raios-X em Alto Ângulo (WAXS – Wide Angle X-Ray Scattering) das matérias-primas em pó, SPI e ALG, e dos filmes nas diferentes concentrações de ALG e pHs, foi realizada em um difratômetro de bancada (Rigaku MiniFlex 300, Tokyo, Japan). O equipamento operou a uma voltagem de 50 kV e corrente de 30 mA, utilizando radiação monocromática de Cu, $L = 1,542 \text{ \AA}$ e linha K. Os difratogramas foram obtidos entre os ângulos (2θ) de 5 a 60° a uma velocidade de varredura de 1° min^{-1} . O índice de cristalinidade relativa (ICR) foi quantitativamente estimado pela relação entre a área dos picos e a área total dos difratogramas (HAYAKAWA et al., 1997), em triplicata.

3.2.3.5 Propriedades mecânicas

A análise foi realizada em texturômetro (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK), em pelo menos 12 corpos de prova de cada formulação, segundo método padrão ASTM D882-12 (ASTM D882-12, 2012).

Foram cortadas amostras retangulares ($70 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$) e colocadas entre as garras dos *probes*, ficando as amostras aparentes na dimensão de $50 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ e os *probes*, com uma separação inicial de 30 mm (Figura 3.1). Durante os testes de tração a velocidade foi fixada em $0,8 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Os dados foram obtidos com auxílio do software EXPONENT, versão 5.1.1.0. O limite de resistência à tração (tensão) foi calculado dividindo-se a força máxima obtida pela área transversal original da amostra (25 mm multiplicado pela espessura média de 5 medidas). A elongação foi calculada dividindo-se a elongação do corpo de prova na ruptura pelo seu comprimento inicial (50 mm), e o Módulo de Young (MY) foi obtido através da curva força versus deformação, calculado pelo coeficiente angular da região linear do gráfico.

Figura 3.1 – Corpo de prova antes do rompimento durante análise das propriedades mecânicas TA.XT PLUS.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.3.6 Propriedades óticas

Para determinar os parâmetros de cor e a opacidade dos filmes foi utilizado um espectrofotômetro de bancada (HunterLab, ColorFlex, Estados Unidos). Os filmes foram cortados em formato circular com diâmetro de 7,0 cm e colocados na abertura do Hunter, que foi previamente calibrado. O sistema utilizado foi o CIEL*a*b*, em que os parâmetros nele contidos são o L* (dimensão da claridade, sendo que L* = 100 representa o branco e L* = 0, o preto), o a* (valor entre o verde, -a*, e o vermelho, +a*), e o b* (valor entre o azul, -b*, e o amarelo, +b*). A opacidade foi determinada através da relação entre a opacidade do filme em um padrão branco (Yb) e a opacidade do filme em um padrão preto (Yp). As análises foram realizadas em triplicata, sendo que, para cada amostra, a leitura foi registrada em quatro posições (ângulos de 0°, 90°, 180° e 270°).

A transmitância foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA). Os filmes foram cortados em retângulos (40 mm × 10 mm) e colocados no centro da cubeta do espectrofotômetro. Em seguida, foi varrida a faixa do comprimento de onda da luz visível, de 200 a 800 nm, para quatro diferentes corpos de prova de cada formulação.

3.2.3.7 Teor de água

O teor de água dos filmes, após terem sido armazenados a 53% UR em recipiente hermético contendo solução saturada de Mg(NO₃)₂ à temperatura de 25 °C, foram

determinados, em triplicata, através de método gravimétrico, a 60 °C em estufa a vácuo (TE-395, Tecnal, Brasil), 10 kPa, até atingir massa constante (AOAC, 1995).

3.2.3.8 Solubilidade em água

A determinação da solubilidade dos filmes, em triplicata, baseou-se na porcentagem de matéria seca solubilizada depois de 24 h de imersão em água destilada (CUQ et al., 1996, SILVA et al., 2016). Os filmes foram cortados em formato circular com 20 mm de diâmetro, pesados e secos a 60 °C em estufa a vácuo (TE-395, Tecnal, Brasil), 10 kPa, até atingir massa constante, para determinação da matéria seca inicial (W_0 , kg); em seguida foram imersos em 50 mL de água destilada e armazenados em câmara de climatização BOD (MA 830/A, Marconi, Brasil) à temperatura de 25 °C com agitação de 60 rpm. Transcorridas 24 horas, as amostras foram retiradas da solução e secadas novamente a 60 °C em estufa a vácuo até massa constante (W_f , kg). A solubilidade, S , foi calculada como a relação entre a matéria seca solubilizada e a matéria seca inicial, de acordo com a Equação 3.1.

$$S = \frac{W_0 - W_f}{W_0} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.9 Isotermas

A construção das isotermas foi baseada no método estático gravimétrico (MOLINA FILHO et al., 2011; AMADO; SILVA; MAURO, 2020), onde as amostras foram expostas a ambiente com umidade relativa controlada por seis soluções salinas saturadas, correspondentes à faixa de atividade de vapor de água entre 0,113 e 0,903 (Tabela 3.1). Previamente à análise, os filmes foram cortados (20 mm × 20 mm) e armazenados em dessecadores contendo sílica gel, por aproximadamente 30 dias. Em seguida, as amostras foram armazenadas em potes herméticos contendo a solução salina correspondente à UR desejada (Figura 3.2a) e estas foram acondicionados em câmaras de climatização BOD (BT 71, Biothec, Brasil) à temperatura de 25 °C. Pesagens periódicas das cápsulas foram realizadas até as amostras entrarem em equilíbrio com o ambiente (Figura 3.2b) e, em seguida, sólidos totais foram analisados. Todos os testes foram conduzidos em triplicata. As amostras estavam com umidade inicial média de $4,33 \pm 0,16$ (kg água/100 kg amostra) e demoraram cerca de 30 dias para atingirem o equilíbrio com as diferentes umidades relativas. Os resultados foram ajustados pelo modelo de GAB (Guggenheim, Anderson e de Boer) (Equação 3.2), cujos parâmetros do modelo não linear

foram estimados pelo critério dos mínimos quadrados, com base no algoritmo de Levenberg-Marquardt (MARQUARDT, 1963).

$$X = \frac{X_m \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w)(1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)} \quad (3.2)$$

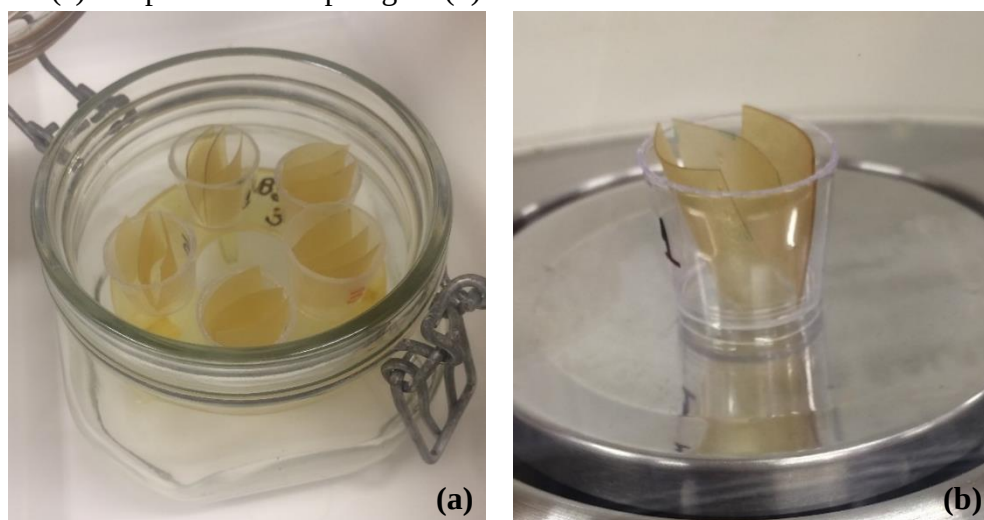
em que: C e K são constantes; a_w é a atividade de água; X é o conteúdo de umidade em base seca (kg água/kg matéria seca); X_m é o conteúdo de umidade da monocamada em base seca (kg água/kg matéria seca), ou seja, o conteúdo de água no momento da saturação de todos os sítios primários de sorção por uma molécula de água.

Tabela 3.1 – Umidade relativa das soluções salinas saturadas a 25 °C.

Sal	Fórmula química	Atividade de água (T = 25 °C)
Cloreto de lítio	LiCl	0,113
Cloreto de magnésio	MgCl ₂	0,328
Brometo de sódio	NaBr	0,576
Cloreto de sódio	NaCl	0,753
Cloreto de potássio	KCl	0,843
Cloreto de bário	BaCl ₂	0,903*

Fonte: GREENSPAN, 1977; *KITIC et al., 1986.

Figura 3.2 – Determinação de isotermas: cápsulas contendo amostras no interior de pote hermético (a) e cápsula durante pesagem (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.3.10 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes comestíveis foi determinada segundo o método padrão ASTM E 96-95 (ASTM E 96-95) e também numa condição adaptada. De acordo com o método padrão da ASTM, a medida foi realizada na condição de umidade média relativa de 51%, com CaCl_2 anidro (2% UR) de um lado do filme e água destilada (100% UR) de outro. A PVA também foi medida na condição de umidade relativa média de 77,3%, com solução saturada de NaNO_2 (64,5% UR) de um lado do filme e solução saturada de BaCl_2 (90% UR) de outro (BRANDELERO; YAMASHITA; GROSSMANN, 2010).

Amostras foram cortadas em círculos com 7 cm de diâmetro e armazenadas a 53% UR por pelo menos 7 dias. Determinou-se a espessura média de cada corpo de prova e, em seguida, estes foram colocados sobre cápsulas parcialmente preenchidas com CaCl_2 anidro (2% UR) ou com solução saturada de NaNO_2 (64,5%), que foram as menores umidades relativas utilizadas nas análises, de modo que a transferência de umidade ocorresse de fora para dentro da cápsula. Os corpos de prova foram fixados na abertura circular da cápsula de alumínio (6 cm) através de um sistema de rosca com vedação de borracha (Figuras 3.3a e 3.3b), e estas foram inseridas em dessecadores que, para cápsulas de CaCl_2 continham água destilada e para cápsulas de NaNO_2 continham solução saturada de BaCl_2 (90% UR). No lado interno das tampas dos dessecadores foram acopladas ventoinhas do tipo *cooler* para aparelhos eletrônicos ligadas a uma fonte alimentada com energia elétrica, com o intuito de promover agitação e homogeneizar rapidamente a fase gasosa no interior do dessecador, uma vez que seu volume é grande, propiciando grande heterogeneidade no ambiente toda vez que o dessecador é aberto.

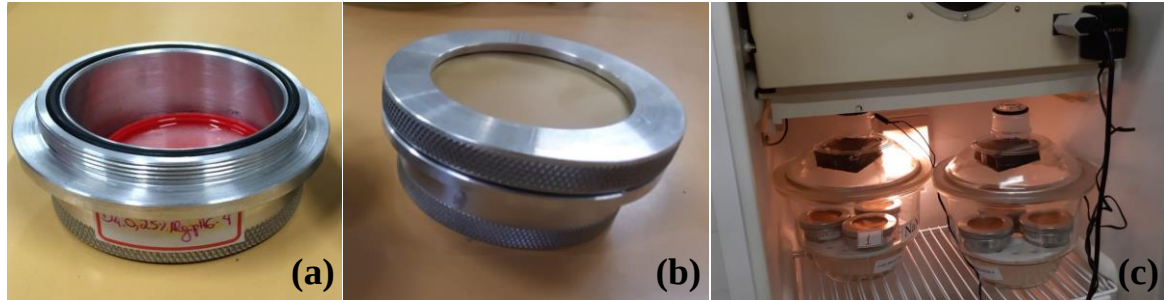
Os dessecadores foram armazenados em incubadora (Tecnal, modelo TE-391, Brasil) a 25 °C (Figura 3.3c), e as cápsulas foram pesadas em intervalos de 1 h, durante um período de 8 h. Determinou-se o ganho de massa de água em balança analítica (BEL Engineering, UMark 250 A, Itália). Em seguida, uma função linear foi ajustada às medidas experimentais de variação de massa de água em função do tempo, e calculou-se o coeficiente angular, que representou a taxa de permeabilidade ao vapor de água, TPVA, em $\text{g água} \cdot \text{s}^{-1}$.

A determinação da PVA foi realizada em duplicata e calculada em $\text{g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$, utilizando a Equação 3.3.

$$\text{PVA} = \frac{\text{TPVA} \cdot e}{A \cdot p_s \cdot ((\text{URE}_1 - \text{URE}_2) / 100)} \quad (3.3)$$

em que: e é a espessura média dos filmes, em m, A é a área de permeação da cápsula ($28,14 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$); p_s é pressão de saturação do vapor de água a 25°C (3169 Pa); URE é a umidade relativa de equilíbrio no interior do dessecador (sub índice 1) e no interior da cápsula (sub índice 2).

Figura 3.3 - (a) cápsula de alumínio com sistema de rosca e vedação de borracha, (b) filme acondicionado na cápsula, (c) dessecadores armazenados em incubadora a 25°C .



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.3.11 Densidade dos filmes

As amostras de filme foram cortadas em pequenos pedaços e condicionadas por 40 dias em dessecadores com cloreto de cálcio anidro, à temperatura ambiente. A densidade foi determinada através de medidas em picnômetro utilizando tolueno como fluido de preenchimento.

3.2.3.12 Transferência de massa em filmes

Para descrever a transferência de massa nos filmes foram utilizados os parâmetros de permeabilidade, solubilidade e difusividade, como proposto por Larotonda et al. (2005).

O fluxo de massa em estado estacionário através de um filme com espessura específica e uma diferença de umidade entre as superfícies, pode ser determinado com base na Lei de Fick (Equação 3.4):

$$J = \rho^s D^w \frac{X_1 - X_2}{\delta} \quad (3.4)$$

em que: J é o fluxo difusivo de água ($\text{kg/m}^2 \cdot \text{s}$), X_1 e X_2 são os teores de umidade da superfície em base seca ($\text{kg água/kg sólido seco}$), ρ^s é a densidade específica do filme seco (kg sólidos/m^3), D^w é o coeficiente de difusão efetivo da água no filme (m^2/s) e δ é a espessura do filme (m).

No equilíbrio termodinâmico, os valores de X estão relacionados com a atividade de água do meio e podem ser determinados pela isoterma de sorção do filme. Para porções lineares de uma isoterma, a umidade do material (X) pode ser relacionada à atividade de água (a_w) como na Equação 3.5 (LAROTONDA et al., 2005):

$$\beta^* = \tan(\theta) = \frac{X}{a_w} \quad (3.5)$$

em que β^* (kg água/kg sólido seco) representa o coeficiente de adsorvidade da água na matriz sólida.

Dividindo-se β^* pela pressão de saturação da água (p_s , Pa) na temperatura em que se caracteriza a isoterma, tem-se a adsorvidade numa forma mais usual, também referida na literatura como coeficiente de solubilidade da água (β) no filme, dado em (g água / g sólidos·Pa).

Substituindo X em função de β na Equação 3.4 tem-se:

$$J = (\rho^s D^w \beta) p_s \frac{a_{w1} - a_{w2}}{\delta} \quad (3.6)$$

O termo entre parênteses na Equação 3.6 corresponde à permeabilidade ao vapor de água do filme (PVA) (Equação 3.3), determinada experimentalmente conforme descrição no item 3.2.3.10. PVA geralmente é representada em [g·(m·s·Pa)⁻¹].

Se uma isoterma de sorção for representada pela equação de GAB (Guggenheim-Anderson-de-Boer), o coeficiente de solubilidade (β) poderá ser determinado para toda a isoterma através da equação diferenciada de GAB em relação a a_w , segundo a Equação 3.7:

$$\beta = \frac{CkX_m}{p_s} \frac{1}{\left[\frac{a_w}{(1-ka_w)(1-ka_w+Cka_w)} \right]^2 \left[k(1-ka_w+Cka_w) + (1-ka_w)(-k+Ck) \right]} \quad (3.7)$$

em que C é a constante relacionada à energia de interação das moléculas na monocamada, k é a constante de GAB relacionada à energia de interação das moléculas adsorvidas na multicamada e X_m é a umidade na monocamada.

Com a determinação experimental da densidade (item 3.2.3.11) foi possível, portanto, calcular o coeficiente de difusão efetivo (D_w), Equação 3.8.

$$D^w = \frac{PVA}{\rho^s \beta} \quad (3.8)$$

3.2.3.13 Permeabilidade ao oxigênio

As taxas de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) foram determinadas, em duplicata, pelo método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma ASTM F 1927 (ASTM INTERNATIONAL, 2014), em equipamento OXTRAN, modelo 2/22, da MOCON, operando com oxigênio puro como gás permeante. Os ensaios foram realizados a 23 °C e a 50 ± 4% UR. A área efetiva de permeação de cada corpo de prova foi de 50 cm². Os resultados obtidos foram corrigidos para 101325 Pa de gradiente de pressão parcial de oxigênio, entre as duas superfícies do filme. Esse gradiente corresponde à força motriz para a permeação do oxigênio através do filme. A partir da TPO₂, calculou-se o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio (PO₂), segundo a Equação 3.9:

$$PO_2 = \frac{TPO_2 \cdot e}{p} \quad (3.9)$$

em que: PO₂ é o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio, em g·m·m⁻²·s⁻¹·Pa⁻¹; TPO₂ é a taxa de permeabilidade ao oxigênio, em g·s⁻¹; e é a espessura média do corpo de prova, em (m); p é a pressão parcial de oxigênio na câmara de gás permeante da célula de difusão (101325 Pa), visto que a pressão parcial de O₂ na câmara do gás de arraste (N₂ + H₂) é considerada nula.

3.2.4 Análise estatística

As réplicas das análises foram expressas na forma de média ± desvio padrão, e as médias foram avaliadas estatisticamente mediante Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 0,05, utilizando o programa Minitab® 16.2.0.

A eficiência dos ajustes foi avaliada com base no coeficiente de determinação do ajuste (R^2) e no módulo relativo médio P(%) (Equação 3.10).

$$P(\%) = \left\{ \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y^{\text{exp}} - y^{\text{calc}}|}{y^{\text{exp}}} \right\} \quad (3.10)$$

em que: n é o número de dados experimentais; y^{exp} representa o valor experimental e y^{calc} o valor calculado.

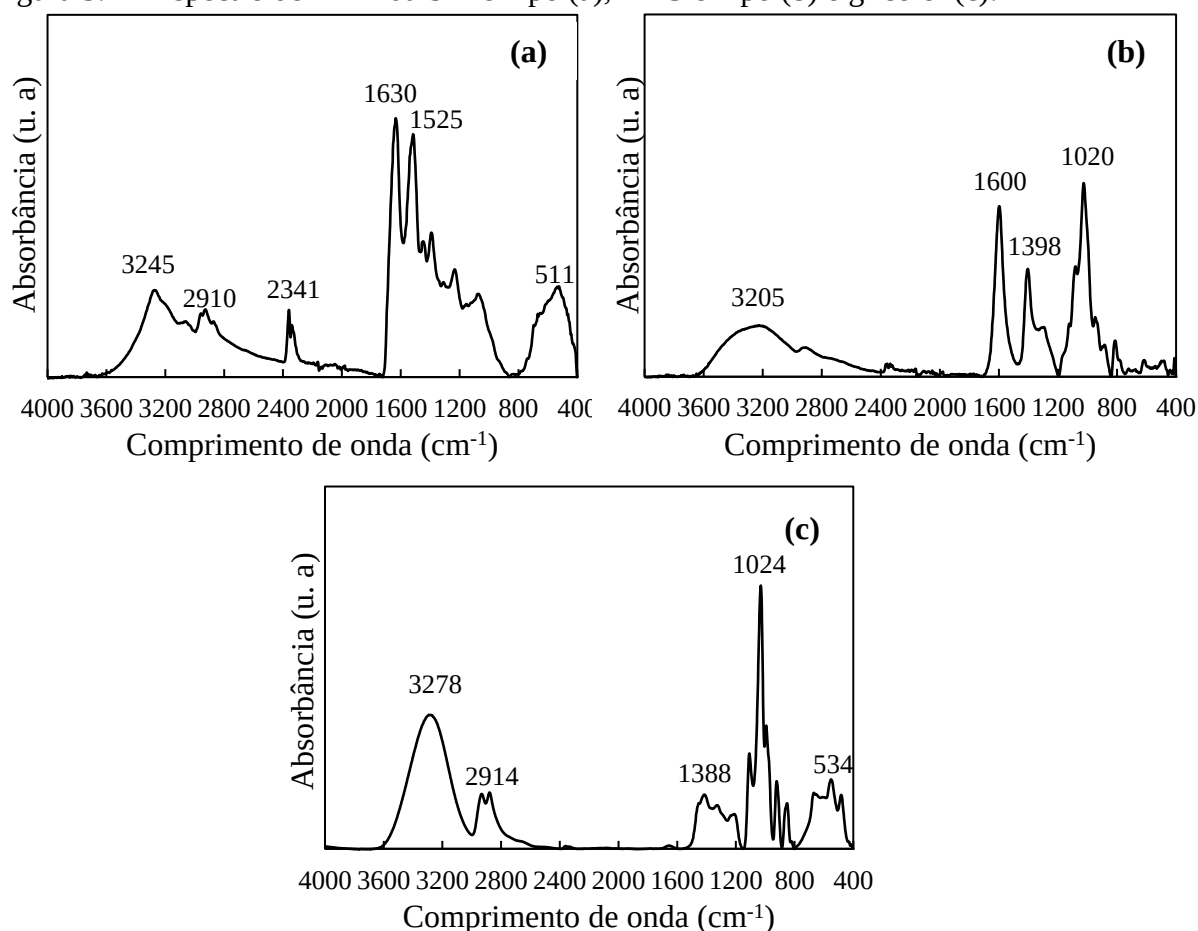
3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 FTIR

Com o intuito de obter informações sobre possíveis alterações a nível molecular nos filmes, estes foram analisados por FTIR. Na Figura 3.4 estão apresentados os espectros de infravermelho do SPI em pó (Figura 3.4a), ALG em pó (Figura 3.4b) e do glicerol (Figura 3.4c), materiais utilizados na elaboração dos filmes.

O espectro do SPI em pó (Figura 3.4a) apresenta algumas bandas principais, como em 3245 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento do grupo O-H; e em 1630 e 1525 cm^{-1} atribuídas às bandas de amida I (estiramento C=O) e amida II (dobramento N-H), respectivamente (SU et al., 2010). O espectro do ALG em pó (Figura 3.4b) apresenta quatro bandas principais, a saber: em $\approx 3205 \text{ cm}^{-1}$; 1600 cm^{-1} ; 1398 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} . A primeira está relacionada ao estiramento O-H, segunda e terceira possivelmente aos estiramentos dos ácidos carboxílicos, e a quarta à vibração de estiramento do grupo C-O (JIN et al., 2019). O glicerol bidestilado, utilizado nos filmes como plastificante, apresentou bandas principais em 3278 cm^{-1} (atribuída ao estiramento do grupo O-H), em 2914 cm^{-1} (atribuído ao estiramento C-H) e em 1024 cm^{-1} (referente ao estiramento do grupo C-O) (RAMOS et al., 2013).

Figura 3.4 – Espectro de FTIR da SPI em pó (a), ALG em pó (b) e glicerol (c).



Fonte: Elaborado pelo autor

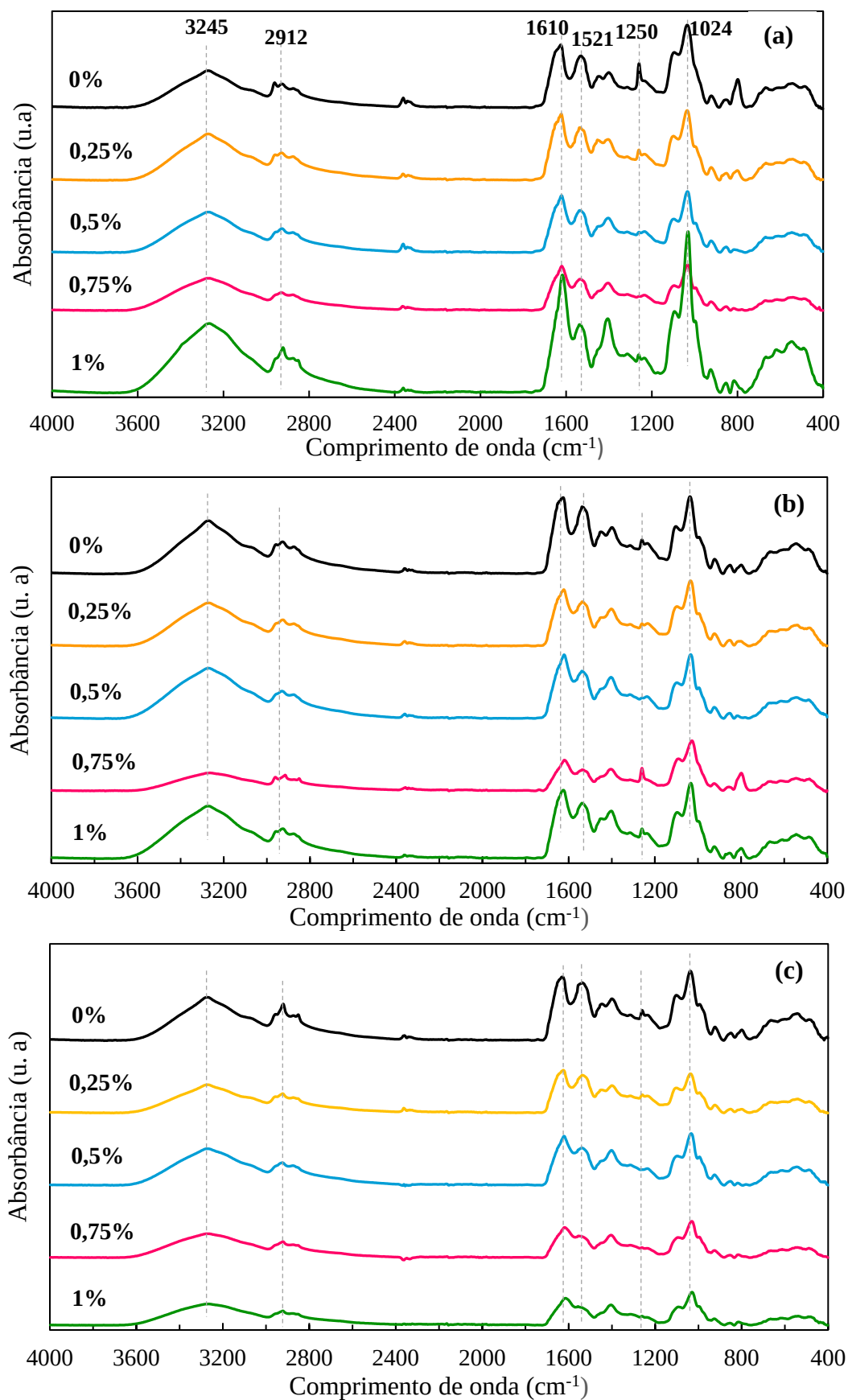
Na Figura 3.5 estão os espectros dos filmes de SPI com diferentes concentrações de ALG, no pH 6 (Figura 3.5a), pH 8 (Figura 3.5b) e pH 11 (Figura 3.5c). Como a concentração de SPI (5%) e do glicerol (40% em massa da SPI) não foi alterada, as diferenças observadas podem ser atribuídas ao ALG e à alteração do pH. No entanto, foram obtidos espectros semelhantes para todas as formulações, com picos em frequências próximas. As principais bandas para todas as formulações foram em 3245, 2912, 1610, 1521, 1250 e 1024 cm^{-1} , com alterações na intensidade dos picos. A banda larga em aproximadamente 3245 cm^{-1} pode ser atribuída ao dobramento N-H e estiramento O-H, os picos em 2912 cm^{-1} ao estiramento C-H, em 1610 cm^{-1} à amida I (estiramento C=O), em 1521 cm^{-1} à amida II (dobramento N-H e estiramento C-N) e em 1250 e 1024 cm^{-1} ao estiramento C-O (RAMOS et al., 2013; XU et al., 2015; WU et al., 2021).

Nos três pHs observou-se uma redução na intensidade das bandas com 0,75% ALG, o que não ocorreu com 1% ALG nos pHs 6 e 8. Ao contrário, no pH 6 a adição de 1% ALG aumentou de forma perceptível a intensidade de praticamente todas as bandas. Notou-se

também que o acréscimo de ALG, principalmente nos pHs 6 e 8, fez com que as bandas referentes à amida I ($\approx 1610\text{ cm}^{-1}$) se tornassem maiores do que a banda referente à amida II ($\approx 1521\text{ cm}^{-1}$), o que pode indicar certa interação entre os biopolímeros. No entanto, pode-se inferir que não houve interação química, apenas interação intermolecular física (como interações de hidrogênio), assim como observado por Li et al. (2016) e Wu et al. (2021).

Comparando-se os pHs é possível notar que no pH 11 praticamente todas as bandas apresentaram menores intensidades, o que pode estar relacionado ao maior grau de desdobramento da proteína nesse pH. Sabe-se que as condições empregadas na elaboração dos filmes influenciam sua estrutura, e que pHs mais básicos favorecem o desdobramento da proteína (GUERRERO; DE LA CABA, 2010).

Figura 3.5 – Espectro de FTIR dos filmes de SPI e SPI-ALG no pH 6 (a), pH 8 (b), e pH 11 (c).



Fonte: Elaborado pelo autor

3.3.2 Análises morfológicas

A microestrutura dos filmes biodegradáveis é uma análise importante a ser realizada, uma vez que está relacionada às interações entre seus componentes, e, portanto, pode ser correlacionada com outras propriedades dos filmes, como mecânicas, óticas e de barreira (ACOSTA et al., 2015).

As Figuras 3.6 e 3.7 exibem as imagens superficiais dos filmes biodegradáveis nos aumentos de 250 e 10.000 $\times$, respectivamente. Já a Figura 3.8 exhibe as imagens transversais dos filmes no aumento de 250 $\times$. Nas Figuras 3.6 a 3.8 cada linha se refere a uma concentração de ALG, sendo (a) 0%, (b) 0,25%, (c) 0,5%, (d) 0,75% e (e) 1% e cada coluna se refere a um pH, sendo a primeira (1) pH 6, a segunda (2) pH 8 e a terceira (3) pH 11.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que os filmes simples formados de SPI nos diferentes pHs estudados apresentaram superfícies lisas com estruturas internas densas (morfologia compacta), e sem presença de poros. No entanto, a adição de ALG induziu mudanças significativas no arranjo estrutural do filme de SPI. Essas alterações podem ser visualizadas para os três pHs analisados (6, 8 e 11) (Figuras 3.6 a 3.8).

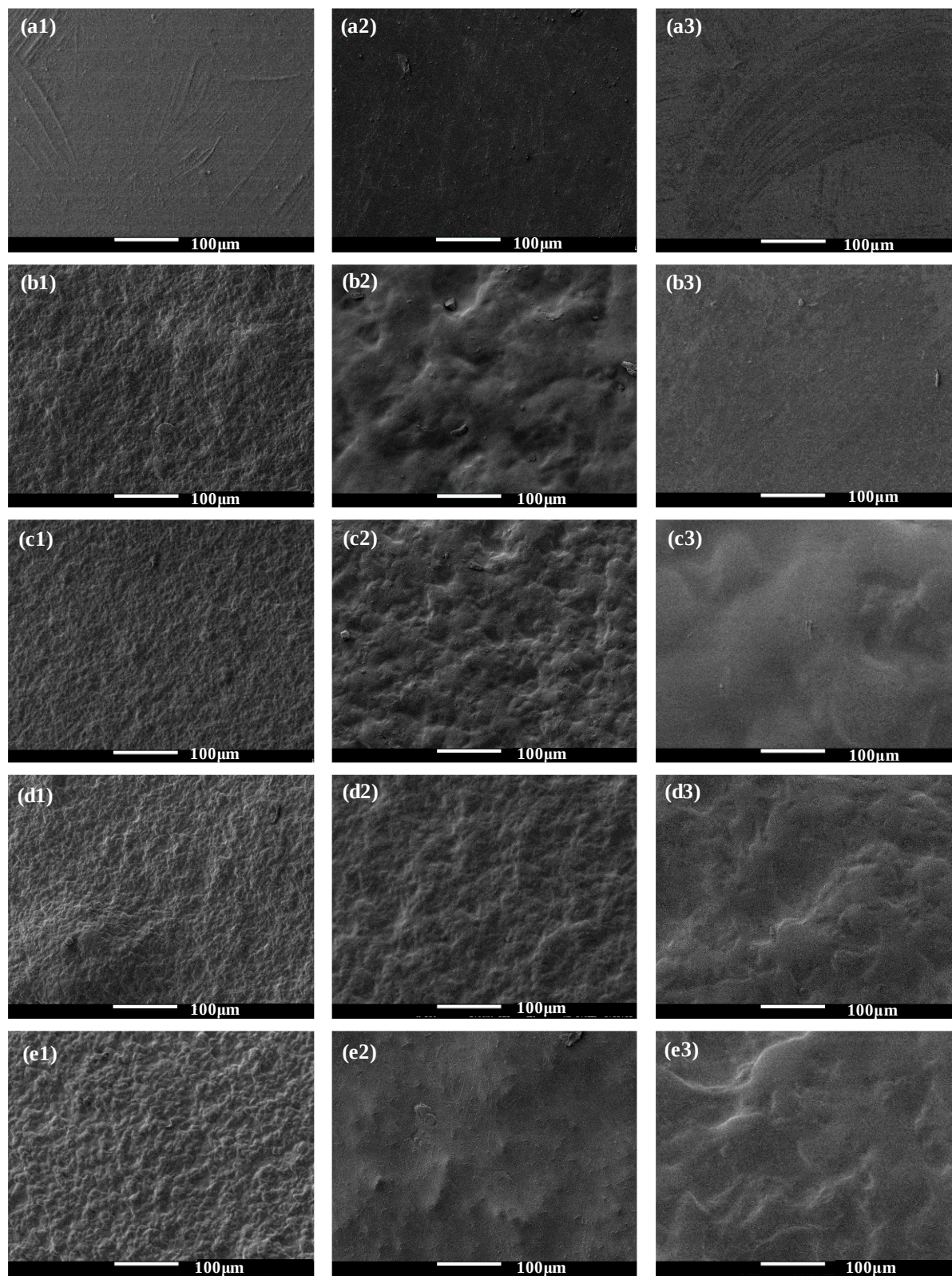
No pH 6 (Coluna 1 das Figuras 3.6 a 3.8) uma microestrutura bastante lisa, uniforme e homogênea foi observada sem adição de alginato (Figura 3.6a1), o que pode indicar homogeneidade do filme elaborado nessas condições (WIHODO; MORARU, 2013). Nas Figuras 3.6b1 a 3.6e1 (com acréscimo de 0,25 a 1% ALG) é possível observar que o alginato é distribuído por toda a estrutura dos filmes de SPI, proporcionando uma superfície mais rugosa e menos homogênea que a do filme SPI sem adição do polissacarídeo. Conforme relatado por Silva et al. (2016), esse comportamento bifásico é consistente com o fato de que a maioria dos sistemas compostos por proteína/ polissacarídeo apresentam incompatibilidade termodinâmica com separação de fase segregativa, e cada fase fica enriquecida em um dos biopolímeros. As micrografias indicam que conforme o alginato é acrescentado, alguns espaços parecem ser preenchidos com o polissacarídeo, formando uma estrutura mais contínua e coesa com maiores concentrações de ALG, principalmente quando atinge a concentração de 1% ALG (Figura 3.6e1). Tal fato pode ser notado também nos pHs 8 e 11.

Em relação ao pH 8 (Coluna 2 das Figuras 3.6 a 3.8), uma alteração ainda mais pronunciada pode ser visualizada com a adição do alginato aos filmes, sendo que uma pequena quantidade do polissacarídeo (0,25%) induz mudança significativa no arranjo estrutural da superfície, e a heterogeneidade da estrutura aumenta até 0,75% de alginato. Com acréscimo de 1% ALG, no entanto, uma estrutura mais homogênea e lisa, que se aproxima daquela observada

em filme de SPI sem ALG, pode ser visualizada na Figura 6e2. Entretanto, pelos aumentos de 10.000× (Figura 3.7e2), pode-se notar diferenças, como o surgimento de elevações na forma de pregas e de blocos (flechas em vermelho), regiões que poderiam indicar maior acúmulo de alginato. Nas concentrações 0,5 e 0,75 % ALG, nas imagens de superfície e aumento 10.000×, também aparecem algumas elevações (flechas em vermelho). As elevações são mais evidenciadas na superfície da formulação 1% ALG (Figura 3.7e2), indicando separação de fases, o que poderia ser atribuído ao acúmulo de matéria em áreas específicas, provavelmente pelo agrupamento de moléculas de alginato. Silva et al. (2018) também encontraram pregas com acúmulo de matéria em áreas específicas da superfície de filmes de proteína isolada de soro de leite (WPI) e pectina de alta metoxilação (PEC), e atribuíram ao agrupamento de moléculas de PEC, reportando notável separação de fases.

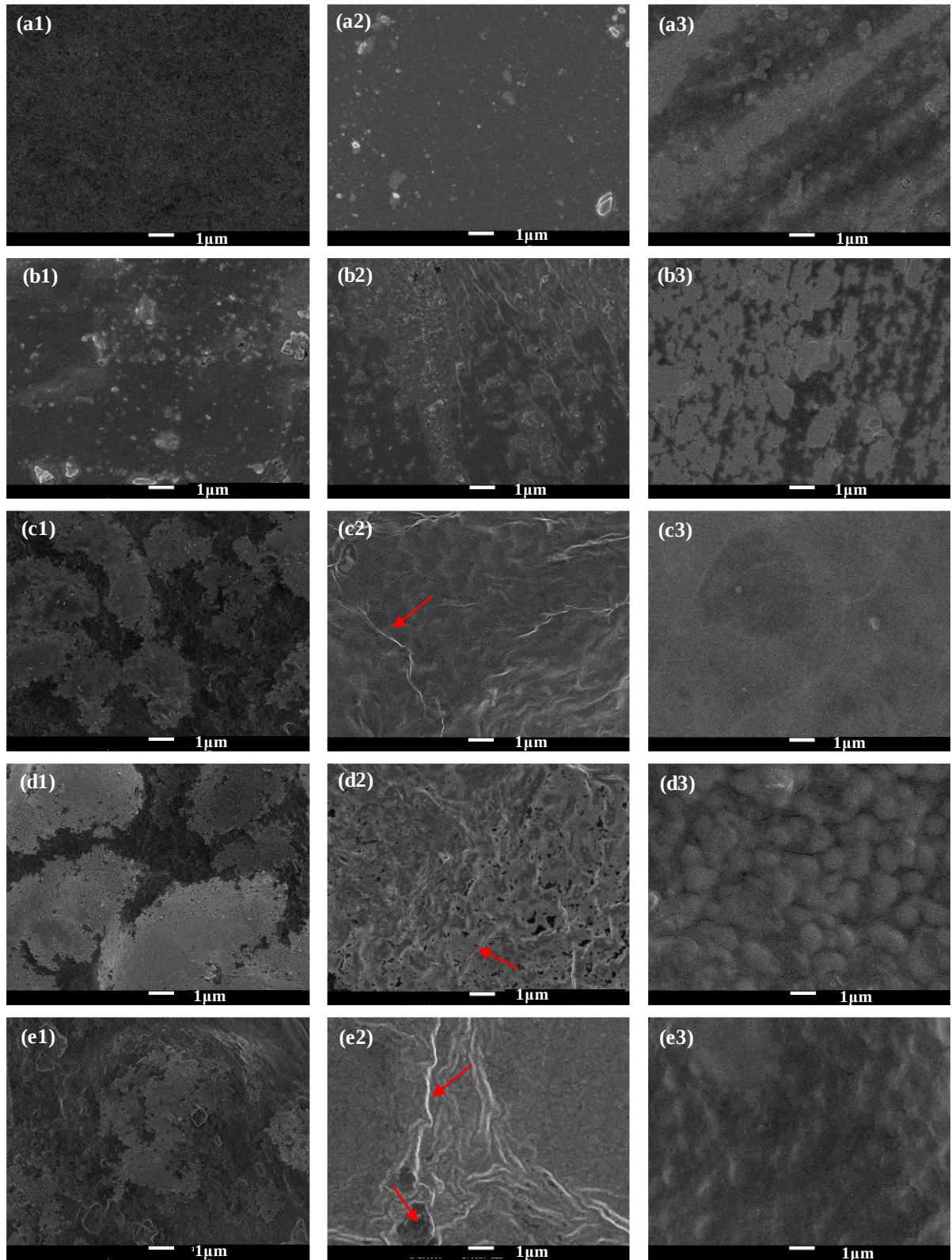
A respeito das imagens no pH 11 (Coluna 3 das Figuras 3.6 a 3.8), observam-se estruturas similares para os filmes sem ALG e com adição de 0,25% de ALG. Ainda com adição de 0,5% constata-se uma boa interação entre os componentes, evidenciada pela estrutura homogênea da superfície e do corte transversal (Figura 3.6c3 e 3.8c3). Vale destacar que as estrias vistas na seção transversal provavelmente são devido ao corte (quebra) do material durante sua preparação. Já com acréscimo de 0,75% ALG parece haver alguma incompatibilidade entre os polímeros, o que pode ser verificado principalmente pela Figura 3.7d3 (superfície no aumento 10.000×). Com 1% ALG, no entanto, percebe-se uma modificação da estrutura, uma vez que há separações, mas, provavelmente pela maior participação do ALG, há zonas maiores de continuidade. Tal fato pode ser verificado principalmente pela Figuras 3.7e3.

Figura 3.6 – Superfície dos filmes SPI (5%) com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, respectivamente, no pH 6 (1), pH 8 (2) e pH 11 (3). Aumento de 250 $\times$.



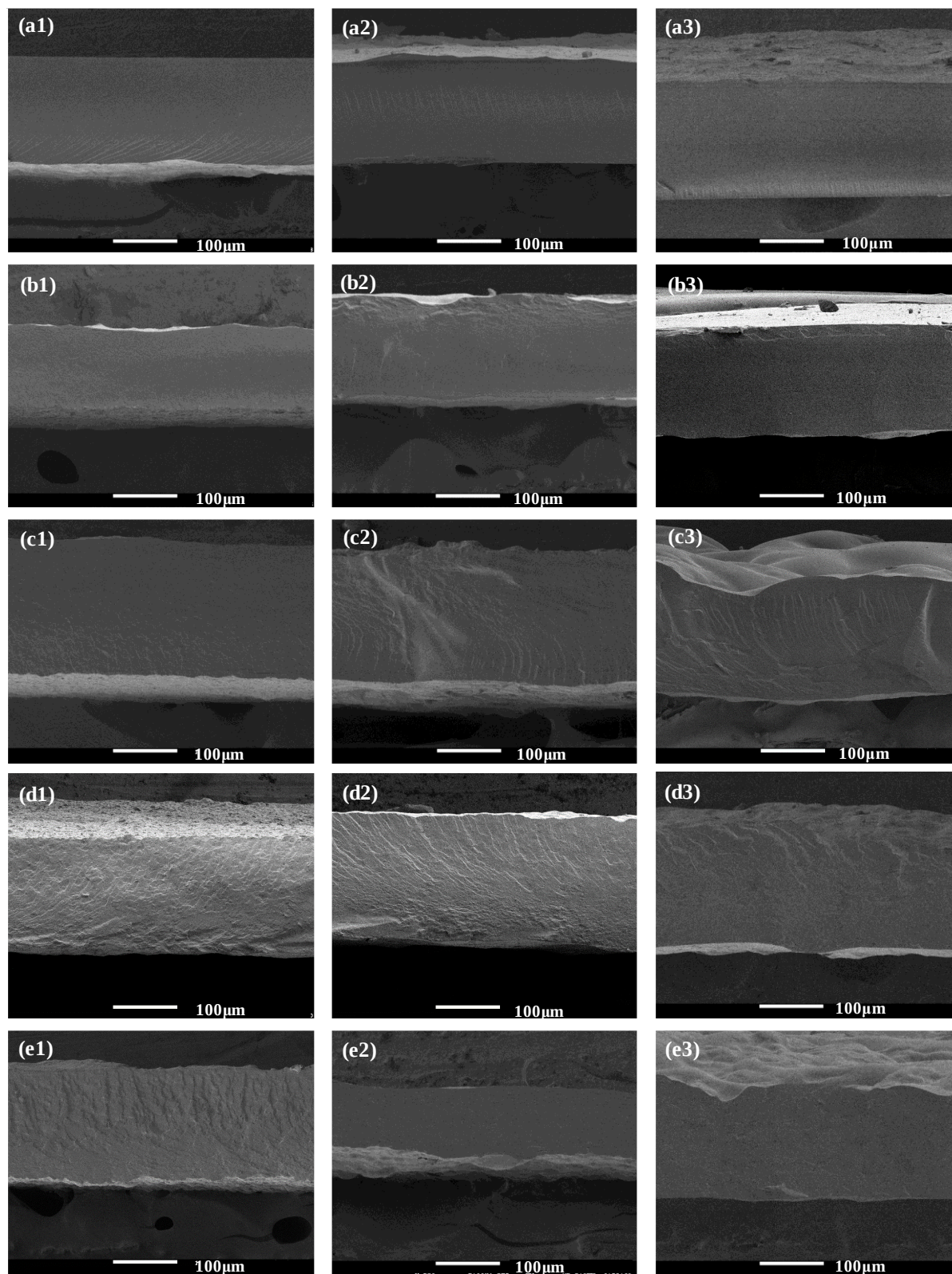
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3.7 – Superfície dos filmes SPI (5%) com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, respectivamente, no pH 6 (1), pH 8 (2) e pH 11 (3). Aumento de 10.000 $\times$.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3.8 – Seção transversal dos filmes SPI (5%) com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, respectivamente, no pH 6 (1), pH 8 (2) e pH 11 (3). Aumento de 250 $\times$.



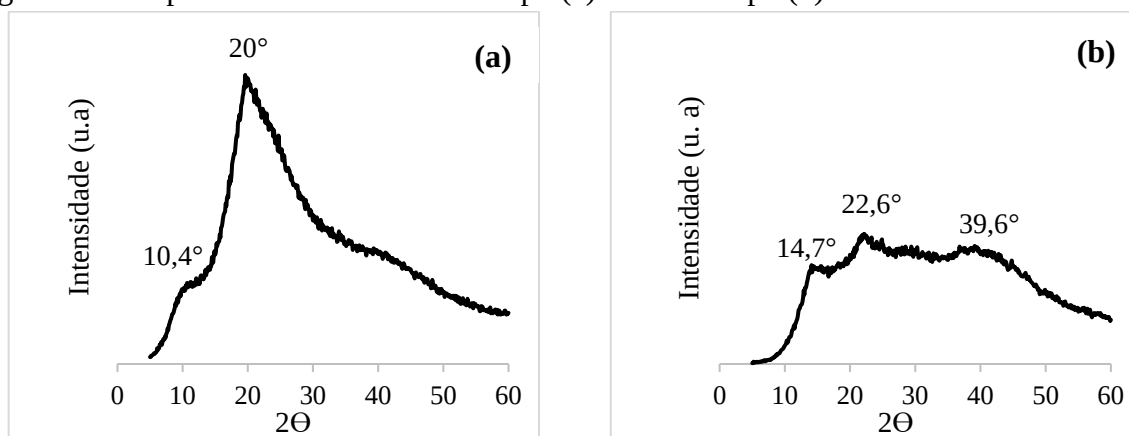
Fonte: Elaborado pelo autor

3.3.3 Raio-X e cristalinidade relativa

A Figura 3.9 apresenta os espectros de Raio-X das matérias primas utilizadas na elaboração dos filmes, pó de SPI (Figura 3.9a) e pó de ALG (Figura 3.9b).

SPI em pó apresentou um pico principal, exibido a 20° , que pode ser atribuído a α -hélice, e um outro discreto em $10,4^\circ$, referente a folha- β da estrutura secundária da proteína (XIA et al., 2015; OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021). ALG em pó exibiu picos discretos de cristalinidade em $2\Theta = 14,7^\circ$; $22,6^\circ$ e $39,6^\circ$. O índice de cristalinidade relativa (ICR) da SPI foi de 34,73% e do ALG 7,57% (Tabela 3.2), ambos considerados materiais com baixo grau de cristalinidade.

Figura 3.9 – Espectro de raio X da SPI em pó (a) e ALG em pó (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

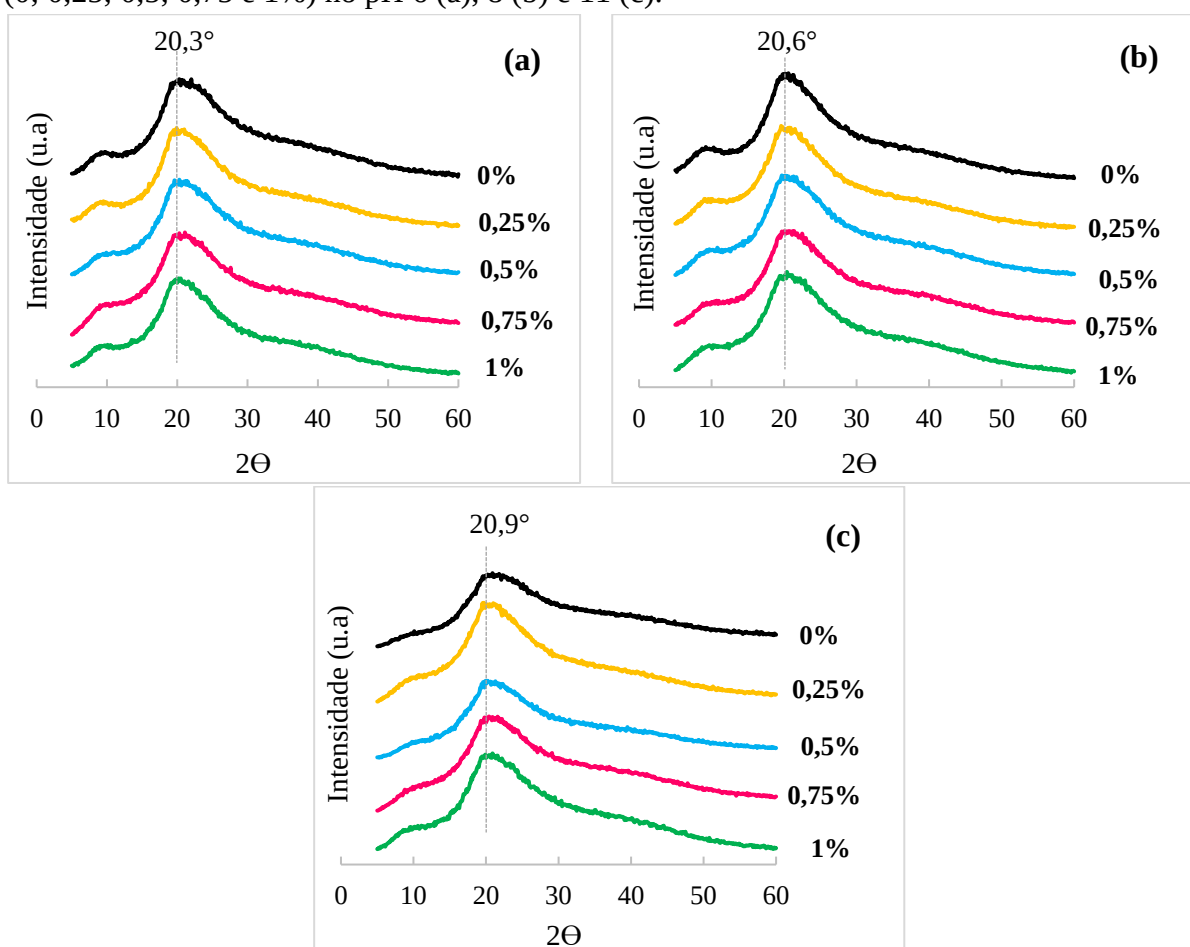
Na Figura 3.10 estão apresentados os espectros de raios X dos filmes elaborados com 5% SPI e adicionados de 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% de ALG, no pH 6 (Figura 3.10a), pH 8 (Figura 3.10b) e pH 11 (Figura 3.10c). Observa-se que os filmes exibiram padrões semelhantes ao SPI em pó, provavelmente por estar em maior quantidade da formulação (5%). No pH 6 o índice de cristalinidade relativa (ICR) dos filmes variou de 28,34 a 39,27%, no pH 8 de 31,56 a 37,25 e no pH 11 de 29,19 a 32,67 (Tabela 3.2). No geral, menores diferenças e médias foram obtidas no pH 11, indicando que no pH mais básico os filmes a base de SPI são mais amorfos. Pela Figura 3.10 notou-se um deslocamento dos picos com o pH, aumentando de $2\Theta = 20,3^\circ$ no pH 6 até $2\Theta = 20,9^\circ$ no pH 11, indicando que houve alteração na estrutura dos filmes com o pH, fato que pode ser comprovado pelas imagens de MEV (Figuras 3.6 a 3.8).

No pH 6 os menores índices de cristalinidade relativa foram obtidos com 0,5 e 0,75% ALG, que foram as formulações que apresentaram microestruturas com separação de fases mais evidenciada (Figura 3.7c1 e 3.7d1). No pH 8 os menores valores de ICR foram obtidos nas

concentrações de 0,5 a 1% ALG, que foram as concentrações com evidente acúmulo de polissacarídeo na superfície, que também pode indicar separação de fases (Figuras 3.7c2, 3.7d2 e 3.7e2). Do mesmo modo, no pH 11, a formulação com 0,75% ALG (Figura 7d3) foi a com menor ICR. Portanto, pode-se concluir que as formulações com microestruturas que apresentaram separação de fases mais visível (Figura 3.7) foram as mais amorfas (Tabela 3.2).

No pH 6 o ICR aumentou com 0,25% ALG e depois diminuiu com maiores concentrações do polissacarídeo, exceto com 1% ALG. No pH 8 o ICR não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com 0,25% ALG e seu valor caiu progressivamente com acréscimo de maiores concentrações de ALG. No pH 11, diferentemente dos demais pHs, a adição de alginato praticamente não alterou a cristalinidade, exceto para a concentração de 0,75 % ALG, que apresentou queda no índice de cristalinidade em relação ao filme sem alginato (Tabela 3.2). Na imagem da microscopia eletrônica de varredura (Figura 3.7d3) é possível notar que o filme com 0,75% apresentou certa incompatibilidade, com separação de fases, o que pode estar relacionado ao menor ICR dessa formulação.

Figura 3.10 – Espectro de raio X dos filmes SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (a), 8 (b) e 11 (c).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3.2 – Índices de cristalinidade relativa (ICR) dos filmes de SPI adicionados de diferentes concentrações de ALG e elaborados em diferentes pHs.

pH	Concentração de ALG (%)	Cristalinidade Relativa (%)
6	0	36,19, $\pm$ 0,09 ^{b,A}
	0,25	39,27 $\pm$ 0,94 ^{a,A}
	0,5	33,94 $\pm$ 0,41 ^{c,A}
	0,75	28,34 $\pm$ 0,64 ^{d,B}
	1	34,77 $\pm$ 0,23 ^{bc,A}
8	0	36,70 $\pm$ 0,31 ^{a,A}
	0,25	37,25 $\pm$ 0,26 ^{a,B}
	0,5	32,97 $\pm$ 0,29 ^{b,B}
	0,75	32,32 $\pm$ 0,26 ^{bc,A}
	1	31,56 $\pm$ 0,57 ^{c,B}
11	0	32,67 $\pm$ 0,29 ^{a,B}
	0,25	31,39 $\pm$ 0,87 ^{ab,C}
	0,5	32,65 $\pm$ 0,28 ^{a,B}
	0,75	29,19 $\pm$ 0,93 ^{b,B}
	1	31,82 $\pm$ 1,32 ^{a,B}
SPI em pó		34,73 $\pm$ 0,81
ALG em pó		7,57 $\pm$ 0,28

*Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão)

**a,b,c,d Letras minúsculas diferentes na mesma coluna no mesmo pH indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B,C Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de alginato indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.3.4 Propriedades mecânicas

As embalagens de alimentos devem ser resistentes às diferentes tensões externas, para que o produto não seja exposto ao ambiente durante o manuseio e armazenamento (TONYALI; CIKRIKCI; OZTOP, 2018). Portanto, essa análise é de extrema importância na caracterização de filmes biodegradáveis e comestíveis, determinando as potenciais aplicações dos filmes elaborados (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014).

Para avaliar essa propriedade os testes mais utilizados são o de tração, divisão da força máxima pela área transversal original da amostra; a elongação, divisão da elongação do corpo de prova na ruptura pelo seu comprimento inicial; e o módulo de Young (MY), relacionado à

rigidez do material e medido pela força necessária para deformar um corpo de teste, sendo calculado pela tangente da parte linear inicial da curva força *versus* deformação, região na qual a deformação é elástica. Esses dados estão apresentados na Tabela 3.3, para os filmes formados nos diferentes pHs e com as diferentes concentrações de ALG.

As propriedades mecânicas de filmes de SPI podem ser afetadas pelo pH, uma vez que em valores distantes do ponto isoelétrico as proteínas podem ser desnaturadas, expondo seus grupos funcionais e aumentando as interações intermoleculares (MAURI; AÑON, 2006; KOSHY et al., 2015). No presente estudo verificou-se que, exceto para formulação 1% ALG, o aumento do pH de 6 para 8 ocasionou redução da resistência mecânica e aumento da elongação nas condições de 0, 0,25 e 0,5% de ALG, mas não nas maiores concentrações. O aumento dos pHs 6 e 8 para 11, porém, levou a um aumento da resistência. Comparando-se as concentrações de ALG nos diferentes pHs, notou-se que o pH 11 foi o que proporcionou maiores valores de resistência aos filmes de SPI (5%), em todas as concentrações de ALG.

Sabe-se que quanto maiores as interações intermoleculares entre os polímeros maior pode ser a resistência à tração dos filmes (KOSHY et al., 2015). Portanto, os resultados de tensão podem indicar maior interação entre os polímeros no pH 11, menor interação no pH 8 para concentrações baixas de alginato (igual ou menor que 0,5%), e menor interação no pH 6 para concentração de 1% ALG, sendo que nessa concentração a tensão foi significativamente menor ($p < 0,05$) que nos demais pHs.

O pH afeta a carga da proteína e seu grau de desnaturação, sendo que quanto mais distante do ponto isoelétrico, mais facilmente as proteínas sofrem desnaturação e desdobramento (MAURI; AÑON, 2006). No pH 11, esse desdobramento exporia grupos sulfidrila e hidrofóbicos, contribuindo para interações intermoleculares e levando à formação de uma rede proteica mais coesa. Mauri e Añon (2006), ao estudarem o efeito do pH sobre propriedades mecânicas e solubilidade de filmes de proteína de soja, encontraram na composição das frações solúveis de filmes obtidos em pH 8, grande concentração de agregados de alta massa molecular, superior ao encontrado em filmes obtidos em pH 11, o que sugeriria uma reticulação mais pobre no pH mais baixo.

Comparando-se os filmes de SPI obtidos em pH 8 e pH 6, ainda que as cargas líquidas das soluções filmogênicas de SPI nesses dois pHs sejam semelhantes (Figura 2.1a do Capítulo 2), aspectos conformacionais das proteínas em cada um dos pHs podem ter propiciado interações diferentes, afetando a formação de microestrutura desses filmes. Nas imagens das Figuras 3.6.a1 e 3.6.a2, e das Figuras 3.7.a1 e 3.7.a2, constata-se alguma granulidade nos filmes obtidos em pH 8, enquanto os obtidos em pH 6 apresentam superfície mais lisa.

O bom desempenho mecânico observado no filme de SPI em pH 6 também se estendeu aos filmes com adição de alginato nesse pH, ainda que nele a proteína de soja seja parcialmente insolúvel, o que poderia levar a um *crosslinking* limitado (WIHODO; MORARU, 2013). Em pH 6 percebe-se que, apesar das menores deformações, os filmes apresentaram significativos valores de tensão e módulo de Young. O MY foi significativamente menor ($p < 0,05$) que nos outros pHs apenas para concentração 1% ALG. Maiores valores de MY estão relacionados a materiais mais rígidos. As baixas deformações e altos módulos de Young nos filmes obtidos no pH 6 estariam relacionados à conformação das proteínas e consequente estruturação dos filmes, microestrutura (Coluna 1 das Figuras 3.6 a 3.8).

Nas concentrações de ALG até 0,75% no pH 6 e em todas as concentrações nos demais pHs (8 e 11) o comportamento observado foi de maior resistência à tração e menor elongação na ruptura com o aumento da concentração de ALG. Isso poderia ser explicado com base numa separação segregativa de fases que pode levar ao fortalecimento da rede proteica devido ao efeito do volume excluído (OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021; SILVA et al., 2016). O modelo do volume excluído estabelece que cada polímero pode ocupar apenas uma parte do volume da mistura, resultando no aumento da concentração de cada fase, o que reforçaria a rede proteica (CHAUX-GUTIERREZ et al., 2019). Além disso, outros fatores também devem ser considerados. Como reportado por Silva et al. (2016), o polissacarídeo exerceria o papel de um agente de preenchimento, expandindo os espaços internos da rede proteica, o que reforçaria a estrutura.

A menor resistência do filme somente de SPI detectada em pH 8 também foi constatada nas concentrações mais baixas de alginato (0,25% e 0,5%) em comparação com os demais pHs. Observou-se que nos pHs 6 e 11 um acréscimo de 0,25% de alginato já provocou médias significativamente ($p < 0,05$) maiores de resistência nos filmes de SPI, enquanto no pH 8 um aumento significativo ocorreu somente a partir de 0,5%ALG. No pH 8 notou-se aumento da resistência à tração e do módulo de Young e queda da elongação conforme o polissacarídeo foi sendo adicionado. Na maior concentração de ALG (1%) o filme apresentou tensão e MY 3,2 e 4,6 vezes maior, respectivamente, do que o filme formado somente por SPI, enquanto a elongação foi 3,8 vezes menor.

No pH 11 observou-se que adição de 0,25% aumentou o valor da tensão e diminuiu a elongação de forma significativa, e a adição de ALG 0,5% e 0,75% não alteraram a tensão em relação ao filme ALG 0,25%. Quanto à elongação, essa foi ainda menor com 0,5% ALG, e manteve-se nas concentrações maiores. O filme com adição de 1% de polissacarídeo apresentou tensão e MY significativamente maiores ($p < 0,05$) que as demais formulações, sendo,

respectivamente, 1,9 e 2,1 vezes maior do que o filme formado somente por SPI. Em relação a alongação na ruptura, o filme 1%ALG foi 3,7 vezes menos elástico quando também comparado ao filme sem adição do alginato.

Segundo Miller e Krochta (1997) o aumento da interação molecular resulta em um filme com maior resistência à tração e menos flexível. No presente trabalho, exceto para 1% ALG no pH 6, verificou-se que o aumento da concentração de alginato de sódio incrementou essas características nos filmes elaborados nos três pHs, o que poderia ser explicado pela interação eletrostática entre os dois polímeros. Entretanto, as cargas líquidas das soluções filmogênicas com alginato quase não apresentaram diferenças entre os pHs 6, 8 e 11, ainda que se constate uma tendência de valores mais negativos nas maiores concentrações, mais evidenciada nas soluções em pH 6.

O alginato exerceu um papel de agente de fortalecimento da estrutura de filmes de SPI. Além do preenchimento dos espaços livres através da rede proteica, o efeito do volume excluído e possíveis interações eletrostáticas entre o alginato e a proteína são fatores que, em maior ou menor grau, contribuíram para a estruturação desses filmes, melhorando a coesão das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a resistência dos filmes. Wang et al. (2016), ao estudar interações sinérgicas entre gelatina e goma xantana, constataram que, além do volume excluído, as interações eletrostáticas entre os polímeros poderiam, teoricamente, contribuir para reforçar a estrutura da rede proteica pois, apesar da carga líquida ser negativa acima do ponto isoelétrico da proteína, alguns grupamentos positivos ainda estariam presentes.

Em estudo com proteína (gelatina) e polissacarídeo aniônico (gelana), a adição da gelana (concentrações 1 g/100 e 2 g/100 g) levou a um aumento significativo da tensão nos filmes de gelatina (concentração de 5 g/100 mL) (PRANOTO; LEE; PARK, 2007). Segundo os autores, a gelana pode ter formado redes com as moléculas de gelatina entre os domínios aniônicos da gelana e domínios catiônicos da gelatina, fortalecendo a estrutura do filme.

Apesar dos valores de tensão desses filmes ainda serem considerados baixos frente a filmes plásticos existentes no mercado, verificou-se que a porcentagem de alongação na ruptura dos filmes de SPI (pH 8 e 11), SPI-ALG (0,25%) (pHs 8 e 11) e SPI-ALG (0,5%) (pH 8) foi maior que 100%, e que poderiam ser comparadas àquelas de alguns filmes de polietileno de baixa densidade (LDPE), polipropileno (PP) e cloreto de polivinilideno (PVDC), cuja porcentagem de alongação na ruptura pode variar de 100 a 965% (TIAN et al., 2018).

Além do preenchimento dos espaços livres dentro da rede proteica, o efeito do volume excluído e possíveis interações eletrostáticas entre o alginato e a proteína de soja são alguns

fatores que influenciam a estruturação dos filmes, contribuindo para a coesão das cadeias poliméricas, e, conseqüentemente, melhorando a resistência dos filmes.

Também não se descarta a ocorrência de possíveis alterações estruturais durante a secagem do filme, conforme as cadeias moleculares se aproximam devido à evaporação da água. A comparação entre força do gel das soluções filmogênicas nos três pHs e a resistência mecânica dos filmes nesses mesmos pHs sugere que durante a secagem podem ter ocorrido mudanças conformacionais que privilegiaram a conformação dos filmes em pH 11, uma vez que os géis mais fracos foram formados nesse pH (Capítulo 2, item 2.3.2.2). Outra questão é a ausência do glicerol nas misturas analisadas reologicamente, que afetaria tanto as propriedades reológicas das soluções filmogênicas quanto as conformacionais durante a secagem. Portanto, estudos comparativos teriam que ser conduzidos para elucidar essas questões.

Tabela 3.3 – Espessura (mm), Tensão (MPa), deformação na ruptura (%) e módulo de Young (MPa) dos filmes SPI (5%), nos pHs (6, 8 e 11), e acrescidos de diferentes concentrações de alginato (0,25; 0,5; 0,75 e 1%).

pH	Concentração de ALG (%)	Espessura (mm)	Tensão (MPa)	Deformação(%)	Módulo de Young (MPa)
6	0	0,26 ± 0,02	1,87 ± 0,19 ^{d,B}	97,36 ± 15,74 ^{a,B}	25,17 ± 4,72 ^{b,A}
	0,25	0,23 ± 0,03	2,74 ± 0,23 ^{c,B}	91,93 ± 18,77 ^{a,C}	28,10 ± 3,81 ^{b,B}
	0,5	0,21 ± 0,02	3,27 ± 0,41 ^{b,B}	69,41 ± 11,22 ^{bc,B}	26,08 ± 3,07 ^{b,B}
	0,75	0,22 ± 0,02	4,19 ± 0,52 ^{a,A}	58,35 ± 8,86 ^{c,B}	36,54 ± 7,05 ^{a,A}
	1	0,23 ± 0,01	4,05 ± 0,63 ^{a,B}	76,70 ± 14,77 ^{b,A}	19,99 ± 2,14 ^{c,C}
8	0	0,22 ± 0,03	1,47 ± 0,16 ^{d,C}	221,41 ± 50,36 ^{a,A}	9,48 ± 1,61 ^{c,B}
	0,25	0,22 ± 0,03	1,64 ± 0,12 ^{d,C}	151,77 ± 23,69 ^{b,A}	9,52 ± 1,73 ^{c,C}
	0,5	0,23 ± 0,04	2,20 ± 0,18 ^{c,C}	109,43 ± 14,18 ^{c,A}	13,66 ± 1,89 ^{c,C}
	0,75	0,21 ± 0,02	4,14 ± 0,34 ^{b,A}	66,40 ± 9,04 ^{d,A}	35,95 ± 6,91 ^{b,A}
	1	0,22 ± 0,03	4,73 ± 0,72 ^{a,A}	58,17 ± 11,04 ^{d,B}	43,56 ± 6,54 ^{a,B}
11	0	0,20 ± 0,03	2,77 ± 0,37 ^{c,A}	213,17 ± 29,72 ^{a,A}	24,34 ± 4,25 ^{c,A}
	0,25	0,19 ± 0,02	4,35 ± 0,20 ^{b,A}	130,31 ± 23,39 ^{b,B}	39,37 ± 5,95 ^{b,A}
	0,5	0,24 ± 0,01	4,57 ± 0,47 ^{b,A}	74,27 ± 9,85 ^{c,B}	39,39 ± 6,91 ^{b,A}
	0,75	0,22 ± 0,02	4,52 ± 0,38 ^{b,A}	66,83 ± 7,80 ^{c,A}	34,49 ± 7,54 ^{b,A}
	1	0,26 ± 0,02	5,24 ± 0,41 ^{a,A}	57,06 ± 4,40 ^{c,B}	50,02 ± 7,87 ^{a,A}

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a,b,c,d Letras minúsculas diferentes na mesma coluna no mesmo pH indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B,C Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de alginato indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.3.5 Propriedades óticas

As propriedades óticas dos filmes são parâmetros que podem influenciar sua aceitação em aplicações tanto comestíveis quanto não comestíveis, ou seja, como embalagem, sendo que normalmente os consumidores preferem que as coberturas/ embalagens permitam claramente a visualização dos produtos (ROCHA et al., 2014). No entanto, a cor também está relacionada ao nível de proteção que os filmes podem proporcionar ao alimento, uma vez que uma maior transparência pode indicar menor proteção ao alimento em relação a reações químicas induzidas pela luz (SILVA et al., 2018).

Os resultados de cor e opacidade dos filmes estão apresentados na Tabela 3.4. No Apêndice C é possível verificar o aspecto visual dos filmes formados no pH 11. Pela Figura C1 nota-se que os filmes biodegradáveis e comestíveis obtidos, nas diferentes concentrações de alginato e pH 11, possuem uma superfície contínua e homogênea, ausente de zonas de opacidade ou diferenças de coloração, e sem presença de poros ou áreas de ruptura na rede.

A coloração amarelada de todos os filmes pode ser atribuída à proteína isolada de soja, uma vez que alginato possui coloração transparente. Soliman et al. (2007) produziram filmes de SPI em diferentes pHs e também observaram cor amarelada, b^* variando de 31,29 a 32,61 dependendo do pH, e atribuíram tal coloração aos flavonoides da soja.

Quanto aos valores de opacidade, nota-se que no pH 6 seu valor foi significativamente maior ($p < 0,05$) comparado aos pHs 8 e 11, fato que só não ocorreu nos filmes sem adição de alginato, nos quais a opacidade foi estatisticamente igual em todos os pHs. Observa-se ainda que, em todos os pHs, os filmes sem ALG apresentaram opacidade estatisticamente menor ($p < 0,05$) em relação a todas as concentrações de ALG avaliadas, o que pode estar relacionado à microestrutura mais lisa desses filmes (Figuras 3.6a, 3.7a e 3.8a). Portanto, a adição de alginato aumenta a opacidade dos filmes, sendo que é possível observar um aumento significativo com adição de apenas 0,25% de alginato em todos os pHs. Esse aumento foi de 179% no pH 6, 113% no pH 8 e de 23% no pH 11. Já com acréscimo de 1% ALG o aumento foi de 245% no pH 6, 223% no pH8 e 224% no pH 11, também em relação aos filmes sem ALG. Portanto, a maior e menor concentração do polissacarídeo provocou alterações de opacidade mais pronunciadas no pH 6.

O aumento da opacidade com adição de ALG pode estar relacionado com a incompatibilidade entre polissacarídeos e proteínas, que pode reduzir a transparência de filmes compostos (YOO; KROCHTA, 2011). A incompatibilidade termodinâmica, que causa

separação de fases segregativa, foi também observada na microestrutura dos filmes compostos (Figuras 3.6 a 3.8).

No geral, observou-se que, ao acrescentar o ALG nas formulações, os valores de L^* , a^* , b^* e opacidade foram ligeiramente modificados. Os filmes apresentaram uma menor claridade conforme a concentração do polissacarídeo aumentou, principalmente os filmes 1% ALG, em todos os pHs, uma vez que a média do parâmetro L^* foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação às outras concentrações de ALG. Outros autores também observaram redução do parâmetro L^* (filmes mais escuros) com adição de polissacarídeo a filmes de proteína, que ocorreu, por exemplo, com acréscimo de celulose microfibrilada e ágar em filmes de SPI (ORTIZ et al. 2018; GARRIDO et al., 2016) e com adição de goma mesquita a filmes de WPI (OSÉS et al., 2009).

Em relação aos pHs das soluções filmogênicas, foi possível observar que o pH 11 proporcionou filmes mais amarelos comparados os outros pHs avaliados, uma vez que o parâmetro b^* foi significativamente maior ($p < 0,05$) para esse pH em todas as concentrações de polissacarídeo. Observou-se também que os filmes obtidos com pH 11 possuem valores significativamente menores ($p < 0,05$) do parâmetro L^* quando comparados aos pHs 6 e 8, mostrando que o maior pH resulta em filmes mais escuros. No geral, filmes mais claros foram encontrados no pH 6, no entanto, não diferiram significativamente do pH 8 na maioria das concentrações de alginato. Soliman et al. (2007) produziram filmes de SPI em vários pHs (na faixa de 2 a 12), e assim como presente trabalho, obtiveram menores valores de L^* e maiores valores de b^* com o aumento do pH.

Em relação à adição de ALG nos filmes preparados com soluções no pH 11, verificou-se que os parâmetros L^* , a^* e b^* não sofreram mudanças significativas com acréscimo de 0,25% de alginato, quando comparados aos dos filmes sem polissacarídeo. No entanto, com acréscimo de 1% ALG os filmes tornaram-se mais escuros, com maior valor de a^* e menor valor de b^* , quando comparados ao filme sem alginato.

Em relação ao pH 6 observou-se que as formulações sem alginato e com 0,25% ALG diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação às concentrações maiores e também entre si, para todos os parâmetros de cor estudados. Filmes com concentrações de 0,75 e 1% ALG não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si, em relação a todos os parâmetros avaliados.

A respeito do pH 8, observou-se que os filmes 1% ALG apresentaram coloração mais escura (menor valor do parâmetro L^*) em relação às outras concentrações de ALG, e também valor do parâmetro a^* e opacidade estatisticamente maiores ($p < 0,05$), quando comparados às menores concentrações de ALG.

Tabela 3.4 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) e opacidade com diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs.

pH	Concentração de ALG (%)	L^*	a^*	b^*	Opacidade
6	0	85,01 ± 0,61 ^{b,A}	-2,41 ± 0,11 ^{d,B}	27,52 ± 2,21 ^{b,B}	4,67 ± 0,38 ^{c,A}
	0,25	86,12 ± 0,12 ^{a,A}	-1,55 ± 0,03 ^{c,A}	24,08 ± 0,31 ^{c,C}	13,05 ± 0,27 ^{b,A}
	0,5	83,05 ± 1,00 ^{c,A}	-0,43 ± 0,32 ^{b,A}	31,05 ± 1,43 ^{a,B}	16,67 ± 0,63 ^{a,A}
	0,75	82,83 ± 0,31 ^{c,A}	-0,24 ± 0,15 ^{ab,B}	30,06 ± 1,26 ^{a,B}	16,07 ± 0,91 ^{a,A}
	1	83,00 ± 0,56 ^{c,A}	-0,16 ± 0,25 ^{a,B}	29,80 ± 1,13 ^{a,B}	16,12 ± 0,52 ^{a,A}
8	0	84,38 ± 0,99 ^{a,A}	-2,32 ± 0,21 ^{d,B}	27,06 ± 3,04 ^{c,B}	4,56 ± 0,27 ^{d,A}
	0,25	83,77 ± 0,09 ^{ab,B}	-1,62 ± 0,05 ^{c,A}	26,95 ± 0,52 ^{c,B}	9,70 ± 0,24 ^{c,B}
	0,5	82,91 ± 1,18 ^{b,A}	-1,00 ± 0,32 ^{b,B}	28,12 ± 2,17 ^{bc,C}	12,88 ± 0,68 ^{b,B}
	0,75	82,70 ± 0,79 ^{b,A}	-0,65 ± 0,38 ^{b,C}	29,62 ± 1,62 ^{ab,B}	13,18 ± 0,25 ^{b,C}
	1	81,51 ± 1,27 ^{c,B}	0,25 ± 0,57 ^{a,A}	30,83 ± 1,92 ^{a,B}	14,73 ± 1,19 ^{a,B}
11	0	80,75 ± 0,60 ^{a,B}	-1,92 ± 0,23 ^{c,A}	40,49 ± 1,40 ^{a,A}	4,41 ± 0,26 ^{e,A}
	0,25	80,31 ± 1,39 ^{a,C}	-1,71 ± 0,61 ^{c,A}	38,49 ± 4,24 ^{ab,A}	5,42 ± 0,20 ^{d,C}
	0,5	79,74 ± 1,17 ^{ab,B}	-0,48 ± 0,62 ^{b,A}	38,21 ± 2,64 ^{ab,A}	12,69 ± 0,13 ^{c,B}
	0,75	78,83 ± 0,49 ^{bc,B}	0,14 ± 0,23 ^{a,A}	38,17 ± 0,28 ^{ab,A}	13,98 ± 0,44 ^{b,B}
	1	78,46 ± 0,76 ^{c,C}	0,19 ± 0,28 ^{a,AB}	37,64 ± 1,57 ^{b,A}	14,30 ± 0,21 ^{a,B}

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a,b,c,d,e Letras minúsculas diferentes na mesma coluna no mesmo pH indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B,C Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de alginato indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A Figura 3.11 apresenta a transmitância a luz dos filmes de SPI e SPI-ALG em uma faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Nos comprimentos de onda entre 200-350 nm, todas as formulações apresentaram transmitância próxima a zero, o que indica eficaz propriedade de barreira à luz ultravioleta (UV), o que é essencial para uma embalagem segura aos alimentos, uma vez que a radiação UV está associada a descoloração e é responsável pela degradação oxidativa de alimentos embalados, provocando curto tempo de armazenamento (ZHENG; YU; PILLA, 2017).

Observa-se que as formulações sem acréscimo de alginato correspondem aos filmes que mais transmitem luz e, conforme a concentração de ALG aumentou, a transmissão a luz nos filmes foi reduzida. Sui et al. (2016) adicionaram goma guar (0 a 0,25% m/v) a filmes de SPI

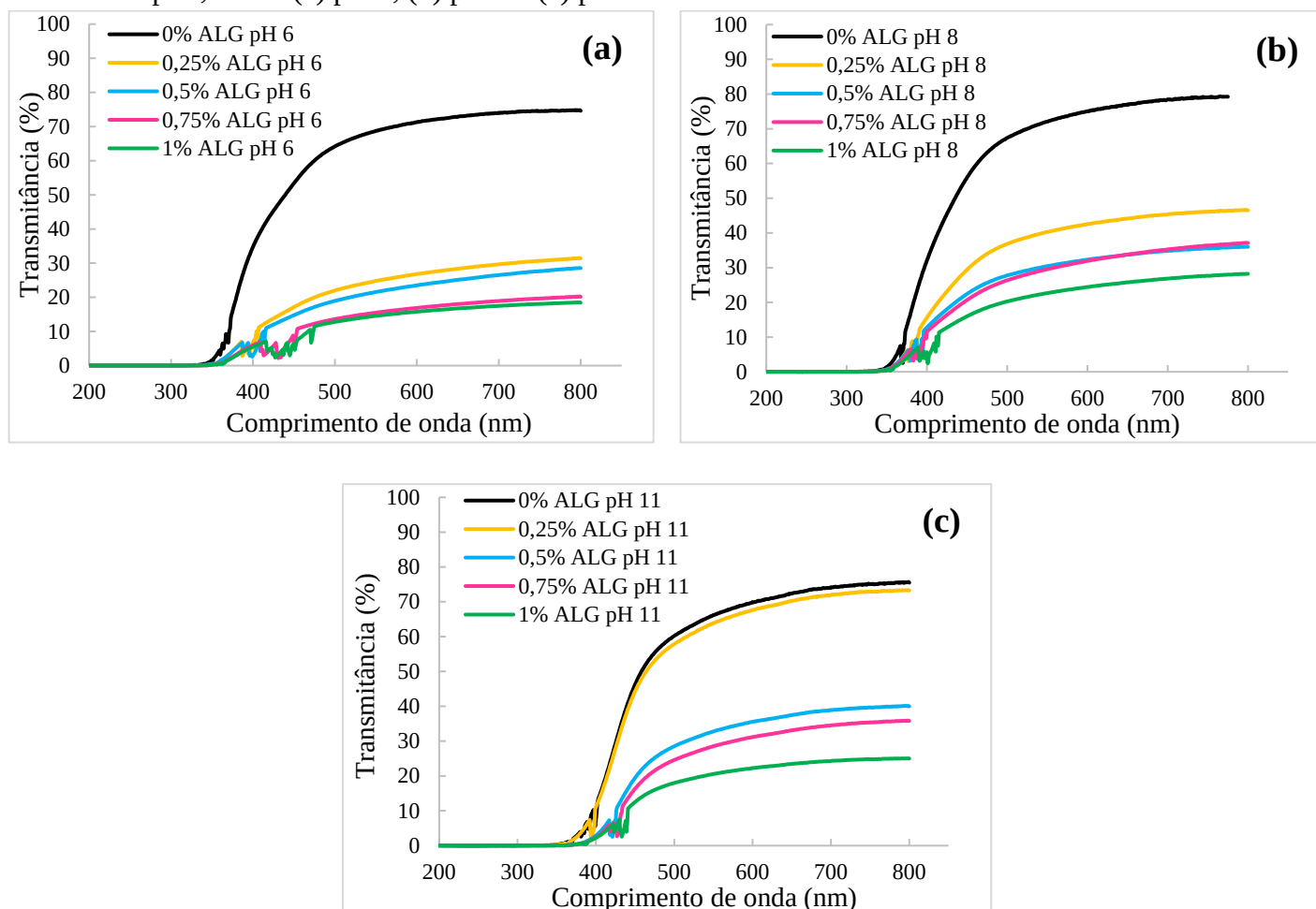
(3% w/v) e observaram comportamento semelhante em vários comprimentos de onda, de 310 a 700 nm.

Apesar do aumento da concentração de ALG reduzir a porcentagem de transmitância para os três pHs estudados, notam-se diferenças na porcentagem de luz que é transmitida para cada concentração, nos diferentes pHs. No pH 6 uma pequena quantidade de ALG (0,25%) pode ser responsável por grandes alterações nas propriedades de barreira à luz dos filmes de SPI, assim como, embora em menor proporção, também ocorre no pH 8. Entretanto, no pH 11 uma quantidade maior de ALG (0,5%) é necessária para modificar perceptivelmente a porcentagem de transmitância. Esses dados corroboram as medidas de opacidade, uma vez que filmes no pH 11 apresentaram opacidades semelhantes para 0 e 0,25% ALG, diferentemente dos demais pHs.

As semelhanças encontradas na transmitância dos filmes 0,75 e 1% ALG no pH 6 e 0,5 e 0,75% no pH 8 também podem confirmar as médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$) de opacidade observadas nesses filmes (Tabela 3.4).

No geral, observou-se poucas alterações nas propriedades óticas das diferentes formulações de filme, com destaque para maior claridade (menores valores do parâmetro L^*) e maior opacidade com adição de ALG aos filmes de SPI, nos 3 pHs analisados. Destaca-se também a contribuição da opacidade para barreira de luz, conforme constatado pela transmitância à luz dos filmes.

Figura 3.11 – Transmitância dos filmes de SPI e SPI/ALG com diferentes concentrações de ALG, nos diferentes pHs, sendo (a) pH 6, (b) pH 8 e (c) pH 11.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.3.6 Teor de água e solubilidade em água

A solubilidade é uma propriedade importante dos filmes e coberturas comestíveis, uma vez que, assim como outras análises, direciona a aplicação de cada filme. Em alguns casos a insolubilidade em água é desejada para manter a integridade do produto e melhorar a resistência à água, enquanto em outros é esperado total solubilidade em água, como no caso das coberturas comestíveis, na qual se deseja que, durante o consumo, a película seja dissolvida na boca, ou em casos em que a solubilidade em água do filme antes do consumo seja benéfica (PEREZ-GAGO; KROCHTA, 2001).

Na Tabela 3.5 estão apresentados os valores de umidade e solubilidade dos filmes de SPI (5%) e SPI-ALG, nas diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs. As análises

foram realizadas com os filmes acondicionados em umidade relativa 53% à temperatura de 25 °C.

Em relação ao teor de água, observou-se que, nas mesmas concentrações de alginato, a umidade diferiu ligeiramente entre os pHs (Tabela 3.5, letras maiúsculas). As diferenças mais marcantes são entre os filmes sem alginato, sendo que a umidade em pH 11 é significativamente menor que nos demais pHs. Diferenças significativas também são verificadas entre o filme em pH mais alcalino (pH 11) e o ácido (pH 6), nas demais concentrações de alginato, porém, o que chama mais a atenção é a tendência de aumento de umidade com o aumento da concentração de alginato, observada nos filmes em pH 11, que não é observada nos demais pHs.

Em relação à solubilidade, observou-se que filmes de SPI e filmes de SPI-ALG não se dissolveram completamente depois de 24 h de imersão com agitação (Tabela 3.5). A mudança de pH e o aquecimento utilizados para solubilização da SPI (pH 11 e aquecimento de 65 °C por 10 min) levaram à desnaturação da proteína, favorecendo várias interações, como ligações dissulfeto intermoleculares, que são difíceis de serem rompidas. Ligações dissulfeto intermoleculares formadas entre proteínas reduzem a interação com a água e, consequentemente, a solubilidade dos filmes (SILVA et al., 2016; PELEGRINE; GASPARETTO, 2005; SILVA et al., 2018). Silva et al. (2018) também observaram dissolução incompleta de filmes de WPI em água. As autoras elaboraram filmes de WPI no pH 7 com a mesma concentração de glicerol e proteína utilizada nesse estudo. Apesar disso, os filmes de WPI foram mais solúveis (67%) do que os filmes de SPI nos três pHs (6, 8 e 11) (Tabela 3.5, valores entre 43 e 46%), indicando maior solubilidade da WPI em comparação com a SPI.

Comparando-se os pHs, é possível notar que para concentrações de até 0,75% ALG o pH 8 proporcionou filmes mais solúveis em água. No entanto, as médias significativamente maiores ($p < 0,05$) no pH 8 foram somente em relação aos filmes 0,5%ALG (pH 6 e 11) e 0,75%ALG (pH 11). Para baixas concentrações de ALG (0 e 0,25%), embora não significativamente, os valores de solubilidade no pH 6 foram menores, o que provavelmente se deve à aproximação do pI da proteína de soja (pH 4,5) (Figura 2.1), onde a solubilidade da SPI é mínima (FREITAS; ALBANO; TELIS, 2017). Mauri e Añón (2006) estudaram a solubilidade de filmes de SPI nos pHs 8 e 11, e também obtiveram maior solubilidade no pH 8, e atribuíram tal fato ao modo como as proteínas da SPI (β -conglucina e glicina) se agregavam durante a formação do filme.

Em relação às diferentes concentrações de ALG, observou-se que, em todos os pHs, o acréscimo de 1% ALG aumentou significativamente ($p < 0,05$) a solubilidade dos filmes quando comparados à formulação sem adição do polissacarídeo. Esse aumento de solubilidade pode ter

ocorrido pelo fato de nos pHs analisados os polímeros apresentarem repulsão de cargas (Figura 2.1), fazendo com que as cadeias apresentassem maior espaço intermolecular disponível para interação com a água (LI et al., 2015).

Assim como as demais propriedades, a solubilidade é influenciada pela estrutura molecular e pelo tipo de interação entre os polímeros. Apesar dos filmes de SPI não terem apresentado diferença de solubilidade nos três pHs avaliados, o pH 11 foi o que causou menores modificações com adição do polissacarídeo. Provavelmente, um *crosslinking* maior entre as moléculas de proteína, o que é esperado no pH 11, estruturou o filme de tal forma que reteve mais a massa de sólidos em comparação com os demais pHs, reduzindo as alterações de solubilidade dos filmes com acréscimo de ALG. Sabe-se que pHs extremos favorecem *crosslinking* entre moléculas de proteína através de ligações covalentes e não covalentes (MAURI; AÑON, 2006), como é o caso do pH 11 no presente trabalho. Entretanto, para elucidar melhor os efeitos do pH e da concentração de alginato sobre a solubilidade, seria necessário determinar a composição do solubilizado.

Tabela 3.5 – Teor de água (g/100 g amostra) e solubilidade em água dos filmes de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs.

pH	Concentração de ALG (%)	Teor de água (g/100 g amostra)	Solubilidade em água (%)
6	0	14,30 ± 0,02 ^{ab,A}	43,29 ± 0,38 ^{d,A}
	0,25	14,31 ± 0,25 ^{ab,A}	47,46 ± 0,57 ^{c,A}
	0,5	14,05 ± 0,09 ^{b,B}	48,80 ± 0,34 ^{c,B}
	0,75	14,16 ± 0,19 ^{ab,B}	51,98 ± 1,29 ^{b,AB}
	1	14,48 ± 0,12 ^{a,B}	56,26 ± 2,09 ^{a,A}
8	0	14,01 ± 0,08 ^{ab,A}	45,83 ± 0,75 ^{d,A}
	0,25	13,91 ± 0,10 ^{b,AB}	49,62 ± 0,78 ^{c,A}
	0,5	14,12 ± 0,08 ^{ab,B}	51,57 ± 0,87 ^{bc,A}
	0,75	14,33 ± 0,30 ^{a,AB}	54,28 ± 1,27 ^{ab,A}
	1	14,03 ± 0,02 ^{ab,C}	55,59 ± 2,14 ^{a,AB}
11	0	12,90 ± 0,24 ^{c,B}	45,59 ± 3,76 ^{b,A}
	0,25	13,71 ± 0,08 ^{b,B}	49,32 ± 2,38 ^{ab,A}
	0,5	14,77 ± 0,17 ^{a,A}	48,31 ± 0,42 ^{ab,B}
	0,75	14,85 ± 0,08 ^{a,A}	50,29 ± 0,51 ^{ab,B}
	1	14,94 ± 0,19 ^{a,A}	51,42 ± 0,97 ^{a,B}
SPI em pó		7,73 ± 0,06	-
ALG em pó		15,62 ± 0,07	-

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a,b,c,d,e Letras minúsculas diferentes na mesma coluna no mesmo pH indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B,C Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de alginato indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.3.7 Isotermas de sorção

Isotermas de sorção de filmes comestíveis podem fornecer importantes informações a respeito da migração de umidade através da sua superfície, uma vez que filmes à base de proteínas e polissacarídeos são sensíveis à umidade, sendo suas propriedades físicas influenciadas pelas mudanças de umidade relativa (ANTONOV; MALLIKARJUNAN; CHINNAN, 2002).

Na Figura 3.12 estão ilustradas as isotermas de sorção dos filmes biodegradáveis à base de SPI e ALG nos diferentes pHs, realizadas à temperatura de 25 °C. Ao observar a Figura 3.12,

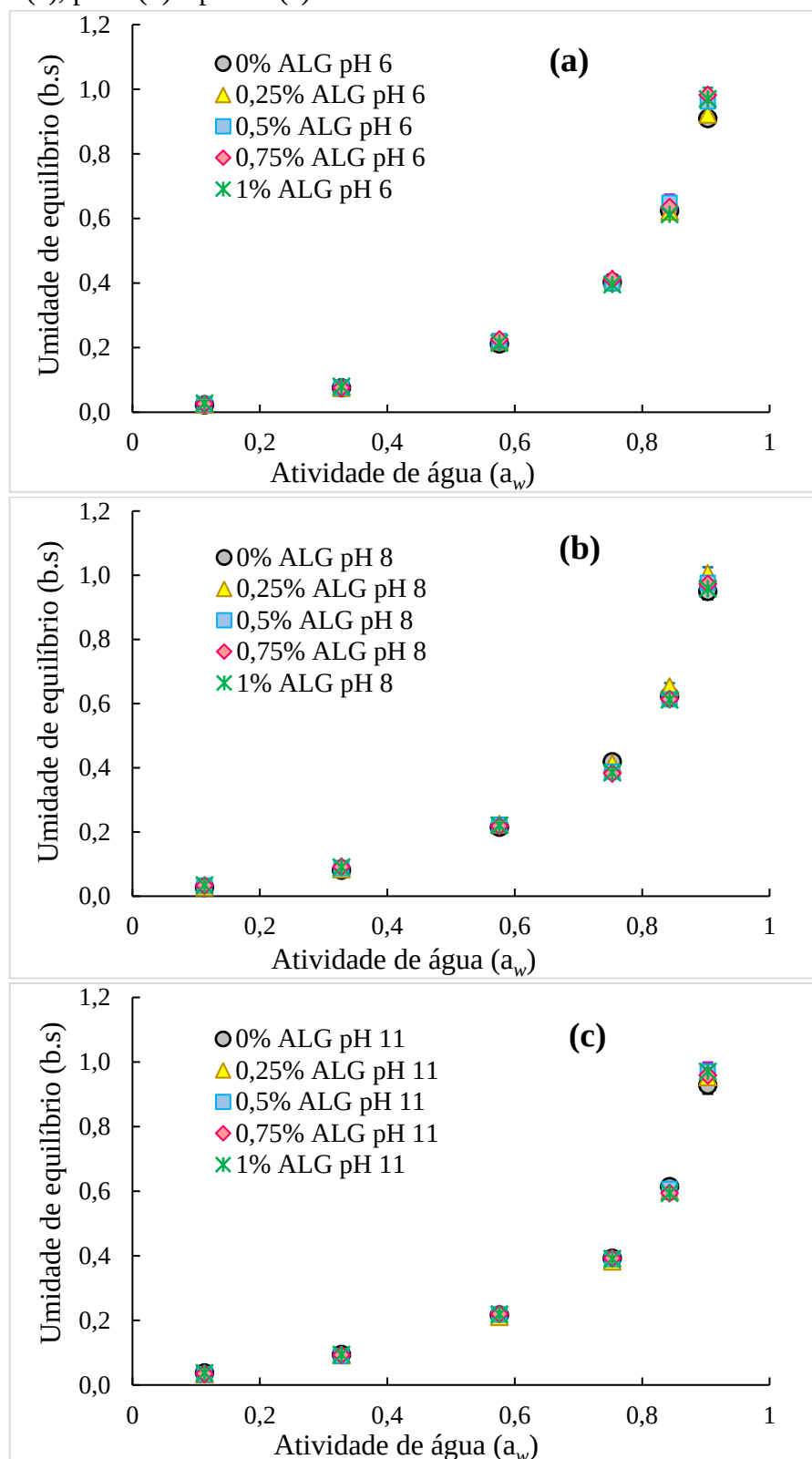
nota-se que, para os três pontos iniciais da curva, onde as condições são de baixa umidade (umidade relativa de 11 a 58%), o comportamento das diferentes formulações analisadas foi muito semelhante, indicando que, nessas condições, a concentração de polissacarídeo utilizado nos filmes de SPI e o pH na faixa de repulsão de cargas não influenciaram a umidade de equilíbrio dos filmes. Além disso, foi possível observar que a umidade de equilíbrio para esses pontos iniciais é baixa, sendo inferior a $0,3 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (b.s), o que indica maior estabilidade dos filmes quando armazenados em ambientes com até 58% de umidade relativa. No entanto, a partir do quarto ponto (umidade relativa de 75%) observou-se que a absorção de água aumentou rapidamente. As isotermas mostraram um comportamento misto entre os tipos II e III, levemente sigmoidal (LEWICKI, 1997; MOLINA FILHO et al., 2011).

Para as umidades relativas acima de 75% foi possível notar sutis alterações com a concentração de ALG e pH utilizados. Alterações mais pronunciadas podem ser visualizadas na maior umidade relativa estudada (90%), sendo que no pH 6 e 11 formulações com adição de ALG acima de 0,5% apresentaram maior umidade de equilíbrio, e no pH 8, apesar das umidades de equilíbrio serem muito próximas com a variação do polissacarídeo, nota-se que a formulação 0,25% de ALG apresentou o maior valor de umidade de equilíbrio.

Os parâmetros obtidos para o modelo de GAB, utilizado para descrever as isotermas de sorção, estão apresentados na Tabela 3.6. Pelos valores do coeficiente de determinação (R^2) e módulo relativo médio (P) nota-se que excelentes ajustes foram obtidos, com valores de R^2 acima de 0,999 e P abaixo de 6%, indicando que o modelo de GAB foi adequado para ajustar os dados experimentais.

Quanto ao conteúdo de umidade da monocamada (X_m), foi possível observar uma tendência de redução com aumento da concentração de ALG, nos 3 pHs avaliados. Amado, Silva e Mauro (2020) avaliaram a sorção de água em filmes de SPI com pectina de alta metoxilação no pH 3, e observaram a mesma tendência quando o polissacarídeo foi adicionado. Notou-se também que quanto maior o pH menores valores de X_m foram obtidos.

Figura 3.12 – Isotermas de sorção dos filmes à base de SPI (5%) e ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) no pH 6 (a), pH 8 (b) e pH 11 (c).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3.6 – Parâmetro do modelo de GAB ajustado aos dados experimentais dos filmes a base de SPI e diferentes concentrações de ALG e pHs.

pH	Concentração de ALG (%)	X_m	C	K	R^2	P (%)
6	0	0,156	1,274	0,940	0,9999	2,141
	0,25	0,149	1,498	0,946	0,9995	4,442
	0,5	0,145	1,462	0,957	0,9994	3,625
	0,75	0,133	1,838	0,968	0,9992	5,663
	1	0,119	2,242	0,978	0,9995	4,303
8	0	0,139	1,716	0,958	0,9994	3,279
	0,25	0,132	1,985	0,972	0,9997	2,852
	0,5	0,112	3,033	0,985	0,9994	4,274
	0,75	0,110	3,172	0,986	0,9997	3,252
	1	0,113	3,039	0,982	0,9996	2,985
11	0	0,121	2,758	0,971	0,9999	2,830
	0,25	0,109	3,231	0,985	0,9998	2,312
	0,5	0,111	3,155	0,986	0,9996	3,585
	0,75	0,108	3,668	0,986	0,9991	4,852
	1	0,106	4,038	0,990	0,9992	4,426

* X_m é o conteúdo de umidade da monocamada em base seca (kg água/kg matéria seca), C e K são constantes.

3.3.8 Permeabilidade ao vapor de água

A determinação das atividades de barreira de filmes comestíveis é de extrema importância, uma vez que, um dos principais objetivos de revestimentos e embalagens de alimentos é o controle da transferência de massa entre o alimento e o meio ambiente (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014). Sabe-se que as interações entre os diferentes componentes da matriz do filme exercem forte influência sobre sua PVA (ACOSTA et al., 2015), o que torna importante o estudo de cada filme elaborado, em busca das características almejadas. Geralmente esperam-se eficientes barreiras ao vapor de água, no entanto, há aplicações em que é necessário que o filme apresente certa PVA, como quando aplicado como cobertura previamente ao processo de secagem, em que se espera que a película não interfira na transferência de massa durante a operação.

A Tabela 3.7 apresenta a permeabilidade ao vapor da água dos filmes de SPI (5%) e SPI (5%) adicionados de diferentes concentrações de alginato, nos pHs 6, 8 e 11, condicionados sob 2 gradientes de umidade relativa (ΔUR).

Os valores encontrados para os filmes somente de SPI (5%) foram da ordem de 10^{-9} a 10^{-10} g/m·s·Pa, cuja variação dependeu do pH e da umidade relativa média. Valores dessa mesma ordem também foram reportados por outros autores para filmes de SPI (GENNADIOS et al., 1994; KOKOSZKA et al., 2010; LI et al., 2016), no entanto, esses valores podem variar em função da umidade relativa utilizada na análise, composição do filme (conteúdo e frações de proteína), pH e condições de secagem (KOKOSZKA et al., 2010).

No presente estudo, filmes formados apenas por SPI (5%) não apresentaram diferenças significativas com a alteração do pH. Os valores foram ainda mais próximos quando são comparados os pHs alcalinos, 8 e 11. Brandenburg, Weller e Testin (1993) avaliaram filmes de SPI (5%) em diferentes pHs (faixa de 2 a 12), com acréscimo de 3% m/m de glicerol e aquecimento de 60 °C por 10 min, e não verificaram diferenças significativas entre os pHs 6, 8, 10 e 12, corroborando o fato de que pHs altos, acima de 6, não provocam efeitos significativos nas propriedades de barreira de filmes de SPI. Cho et al. (2007) também avaliaram a influência do pH (7, 8, 9 e 10) na PVA de filmes de SPI (2 g de glicerol e 5 g SPI/ 100 mL de água destilada), e não detectaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos pHs alcalinos avaliados.

Para umidade relativa de 51% foi possível observar que no pH 6 o filme de SPI apresentou maior valor de PVA. Embora a média não tenha sido significativamente diferente ($p < 0,05$), quando comparados aos outros pHs, o pH 6 apresentou valor em torno de 55 e 40% maior em relação aos pHs 8 e 11, respectivamente. Chae e Heo (1997) pesquisaram a influência do pH (6,75; 7; 8 e 9) na PVA de filmes de proteínas do soro de leite (WPI), e observaram que valores mais altos de permeabilidade ao vapor de água foram encontrados em pH 6,75, menor pH avaliado, assim como verificou-se no presente trabalho para SPI.

Em relação às diferentes concentrações de ALG, verificou-se que estas não alteraram significativamente a permeabilidade ao vapor de água, nos três pHs avaliados. A única diferença significativa encontrada foi em relação ao pH, sendo que na concentração de 1% ALG e UR média de 51%, observou-se que a redução do valor de pH, de 11 para 8, levou a uma média significativamente ($p < 0,05$) menor de permeabilidade ao vapor da água.

Comparando os filmes obtidos com plásticos existentes no mercado, como polietileno de baixa densidade (LDPE), polipropileno (PP) e cloreto de polivinilideno (PVDC), verifica-se que os valores obtidos no presente estudo são altos, o que pode limitar a aplicação desses filmes como embalagens para alimentos de alta umidade. Essa limitação na utilização de filmes à base

de biopolímeros tem sido reportada, e vários pesquisadores estão em busca de embalagens poliméricas com menores valores de PVA (KUMAR et al., 2010; TIAN et al., 2018).

Embora as diferentes concentrações de ALG não tenham modificado significativamente a PVA dos filmes, ao observar os valores encontrados nos filmes com 1% de ALG, pode-se notar que, no geral, foram os que apresentaram maiores permeabilidades ao vapor de água. Tal fato pode ter ocorrido devido a uma desestabilização parcial da matriz proteica por moléculas de alginato, que é um polissacarídeo altamente hidrofílico (CAZÓN et al., 2017; TIAN et al., 2018).

Em relação aos diferentes gradientes de umidade relativa utilizados na análise, observa-se um aumento pronunciado da PVA com o aumento da UR média, para todas as concentrações de ALG, em todos os pHs. Esse aumento está relacionado à maior adsorção da água na matriz do filme, promovendo a saturação dos sítios de ligação da água, o que pode expandir a estrutura e favorecer, assim, a permeação do vapor de água através da matriz (BRANDELERO; YAMASHITA; GROSSMANN, 2010). Portanto, os resultados demonstram que, além da composição e pH do material, a UR que circunda o filme também pode afetar a barreira de permeabilidade ao vapor de água.

3.3.9 Densidade, coeficiente de solubilidade (β) e coeficiente de difusão (D^w)

Os valores de densidade, coeficientes de solubilidade (β) e coeficientes de difusão efetivos (D^w) dos filmes estão apresentados na Tabela 3.7.

A densidade variou pouco entre as amostras, de $1,339 \times 10^6$ a $1,518 \times 10^6$ g sólido seco/m³, e não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando se compararam todas as formulações.

O coeficiente de solubilidade (β) indica a afinidade da matriz dos polímeros pela água (LAROTONDA et al., 2005). No presente trabalho, ele variou de $1,51 \times 10^{-4}$ a $1,81 \times 10^{-4}$ g de água/g sólido seco·Pa com $a_w = 0,51$ e de $6,01 \times 10^{-4}$ a $6,66 \times 10^{-4}$ g de água/g sólido seco·Pa com $a_w = 0,77$. Portanto, constata-se que, aumentando a UR média de 51 para 77%, o coeficiente de solubilidade passa a ser cerca de 4 vezes maior, o que está relacionado à maior saturação dos sítios de ligação da água na maior UR média, como já observado em relação à PVA (BRANDELERO; YAMASHITA; GROSSMANN, 2010).

O coeficiente de difusão representa a capacidade de movimentação das moléculas de água através do filme (LAROTONDA et al., 2005). Para os filmes analisados na menor

umidade relativa média (51%) os valores foram de $2,91 \times 10^{-12}$ a $5,05 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ e na maior UR média (77%) ficaram entre $1,03 \times 10^{-12}$ e $1,96 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Esses resultados sugerem que em maiores atividades de água, a estrutura do filme poderia estar se alterando e afetando a difusividade da água nesses filmes. Ainda assim, a transferência de massa é alta, o que está refletido na alta permeabilidade, cuja elevada solubilidade da água no filme compensaria a baixa difusividade nessa faixa de atividade de água. No entanto, não se descarta o fato de que trata-se de uma metodologia aproximada, sujeita a propagação de erros, além de que os diferentes gradientes de UR utilizados nos experimentos podem estar interferindo nos resultados.

Ao mesmo tempo, constata-se uma tendência de aumento do D^w nas maiores concentrações de ALG, sobretudo na maior concentração analisada (1%), o que provavelmente está relacionado à alta hidrofiliabilidade do alginato (CAZÓN et al., 2017).

Tabela 3.7 – Permeabilidade ao vapor de água ($\text{g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$), densidade (g/m^3), coeficiente de solubilidade ($\text{g/g}\cdot\text{Pa}$) e coeficiente de difusão (m^2/s) dos filmes de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato e diferentes pHs.

pH	ALG (%)	UR media (%)	PVA $\times 10^{10}$ ($\text{g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$)	$\rho \times 10^{-6}$ (g sólido seco/ m^3)	$\beta \times 10^4$ (g de água/g sólido seco $\cdot\text{Pa}$)	$D^w \times 10^{12}$ (m^2/s)
6	0	100 – 2,0 (51,0)	$10,69 \pm 1,68^{a,A}$	$1,486 \pm 0,242$	1,81	3,98
	0,25		$8,77 \pm 1,92^{a,A}$	$1,505 \pm 0,278$	1,80	3,23
	0,5		$8,34 \pm 1,36^{a,A}$	$1,464 \pm 0,236$	1,81	3,16
	0,75		$8,67 \pm 0,78^{a,A}$	$1,477 \pm 0,244$	1,76	3,34
	1		$10,41 \pm 0,63^{a,AB}$	$1,374 \pm 0,110$	1,64	4,63
	0	90 – 64,5 (77,3)	$11,74 \pm 1,86^{a,A}$	$1,486 \pm 0,242$	6,26	1,26
	0,25		$10,89 \pm 1,77^{a,A}$	$1,505 \pm 0,278$	6,26	1,16
	0,5		$9,87 \pm 2,48^{a,A}$	$1,464 \pm 0,236$	6,55	1,03
	0,75		$13,64 \pm 2,59^{a,A}$	$1,477 \pm 0,244$	6,51	1,42
	1		$15,94 \pm 1,56^{a,A}$	$1,374 \pm 0,110$	6,27	1,85
8	0	100 – 2,0 (51,0)	$6,91 \pm 0,79^{a,A}$	$1,339 \pm 0,087$	1,77	2,91
	0,25		$9,45 \pm 1,53^{a,A}$	$1,368 \pm 0,077$	1,77	3,90
	0,5		$9,56 \pm 0,40^{a,A}$	$1,477 \pm 0,255$	1,58	4,10
	0,75		$8,80 \pm 0,67^{a,A}$	$1,348 \pm 0,024$	1,55	4,20
	1		$9,70 \pm 0,19^{a,B}$	$1,518 \pm 0,229$	1,58	4,04
	0	90 – 64,5 (77,3)	$11,67 \pm 2,69^{a,A}$	$1,339 \pm 0,087$	6,35	1,37
	0,25		$12,81 \pm 2,75^{a,A}$	$1,368 \pm 0,077$	6,66	1,41
	0,5		$14,43 \pm 1,06^{a,A}$	$1,477 \pm 0,255$	6,20	1,58
	0,75		$11,92 \pm 2,23^{a,A}$	$1,348 \pm 0,024$	6,13	1,44
	1		$18,17 \pm 1,97^{a,A}$	$1,518 \pm 0,229$	6,12	1,96
11	0	100 – 2,0 (51,0)	$7,66 \pm 0,83^{a,A}$	$1,371 \pm 0,080$	1,64	3,40
	0,25		$7,52 \pm 1,92^{a,A}$	$1,366 \pm 0,152$	1,54	3,59
	0,5		$9,27 \pm 2,29^{a,A}$	$1,452 \pm 0,216$	1,57	4,07
	0,75		$9,86 \pm 1,96^{a,A}$	$1,487 \pm 0,191$	1,52	4,35
	1		$11,44 \pm 0,24^{a,A}$	$1,502 \pm 0,090$	1,51	5,05
	0	90 – 64,5 (77,3)	$12,47 \pm 0,59^{a,A}$	$1,371 \pm 0,080$	6,06	1,50
	0,25		$12,33 \pm 0,90^{a,A}$	$1,366 \pm 0,152$	6,03	1,50
	0,5		$13,18 \pm 3,02^{a,A}$	$1,452 \pm 0,216$	6,19	1,47
	0,75		$13,62 \pm 1,59^{a,A}$	$1,487 \pm 0,191$	6,01	1,52
	1		$17,59 \pm 2,59^{a,A}$	$1,502 \pm 0,090$	6,08	1,93

*Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão)

**a,b,c Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e mesmo ΔUR indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, mesma concentração de alginato e ΔUR indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.3.10 Permeabilidade ao oxigênio

É importante destacar que a análise de permeabilidade ao oxigênio foi realizada somente para os filmes no pH 11, uma vez que os filmes obtidos nesse pH foram os que apresentaram maior resistência à tração (item 3.3.4).

A permeabilidade ao oxigênio refere-se à capacidade que um filme possui de permitir ou não que a molécula de oxigênio o permeie, e desempenha um papel fundamental na manutenção da qualidade de alimentos e na sua estabilidade durante o armazenamento, uma vez que o oxigênio está envolvido em muitas reações de degradação, como escurecimento enzimático, perda de vitaminas e crescimento de microrganismos (GONTARD et al., 1996; SUI et al., 2016). Portanto, a elaboração de filmes biodegradáveis, visando menores permeabilidade ao oxigênio e consequentemente melhor qualidade aos produtos que forem por eles revestidos ou embalados é uma área de pesquisa bastante promissora (McHUGH; KROCHTA, 1994).

Filmes baseados em proteínas são excelentes barreiras ao oxigênio, principalmente em baixas umidades relativas, uma vez que sua natureza polar e estrutura linear geram uma maior coesão e menor volume livre, e entre as proteínas, a de soja é conhecida por apresentar boas propriedades de barreira ao oxigênio (MILLER; KROCHTA, 1997).

No presente trabalho, determinaram-se os valores de permeabilidade ao oxigênio (PO_2) em filmes de SPI (5%) sem e com adição de diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75 e 1%), no pH 11. Os resultados encontram-se na Tabela 3.8.

O valor de PO_2 do filme de SPI ($5,28 \times 10^{-16} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$) foi inferior ao de filmes de WPI ($0,66 \times 10^{-13} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$) (SILVA e al., 2016) e proteína da ervilha ($3,72 \times 10^{-13} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$) (PORTA et al., 2016), por exemplo, confirmando a excelente propriedade de barreira ao oxigênio de filmes de SPI verificada por outros autores (BRANDENBURG; WELLER; TESTIN, 1993; DENAVI et al., 2009). Comparando o valor obtido com filmes sintéticos, observa-se que os valores encontrados podem ser bem menores. Polietileno de baixa densidade (LDPE), por exemplo, também analisado a 50% de UR, apresenta PO_2 de $3,09 \times 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}\cdot(\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2)^{-1}$ (MILLER; KROCHTA, 1997).

Em relação à adição do polissacarídeo, foi possível observar que o alginato reduziu significativamente ($p < 0,05$) a permeabilidade ao oxigênio dos filmes de SPI (5%). Comparando com o filme formado apenas por proteína, a adição de 0,25% de ALG reduziu em 55% o coeficiente de permeabilidade ao oxigênio dos filmes, e conforme aumentou-se a concentração do polissacarídeo, os valores foram ainda menores, chegando a uma redução de 132% na

formulação com 1% de ALG. As únicas formulações que apresentaram médias estatisticamente iguais entre si foram com acréscimo de 0,25 e 0,5% ALG.

A influência da mistura de proteína com polissacarídeo em relação à PO_2 não é muito recorrente na literatura, no entanto, dos trabalhos encontrados a maioria também verificou vantagem na adição do polissacarídeo sobre a diminuição da PO_2 (AMADO; SILVA; MAURO, 2020; OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021; SILVA et al., 2016; PORTA et al., 2016). Silva et al. (2016) verificaram que a mistura de proteína (WPI) e polissacarídeo (LBG) favoreceu a barreira ao oxigênio e, assim como no presente estudo, a formulação com maior concentração de polissacarídeo, que no caso foi de 0,1% LBG, correspondeu à formulação com menor permeabilidade ao oxigênio. Porta et al. (2016) também verificaram que a permeabilidade ao oxigênio de filmes de proteína da ervilha contendo de PEC foi menor em comparação aos valores do filme formados apenas pela proteína.

A redução da PO_2 com adição de ALG, no pH 11 sugere que o polissacarídeo reduziu a hidrofobicidade do filme, aumentando a permeabilidade ao vapor de água e reduzindo a PO_2 , como apontado por Silva et al. (2016). Nesse trabalho, os autores reportam que a adição de goma alfarroba em filmes de WPI reduziu a permeabilidade ao oxigênio e ao gás carbônico, e sugerem que isso estaria relacionado à natureza polar dessas moléculas, configurando um comportamento inverso ao da água, que, mesmo não tendo sido significativo, mostrou uma tendência de aumentar sua permeação através dos filmes com alfarroba. Portanto, a adição do polissacarídeo nos filmes de SPI pode aumentar a barreira ao oxigênio e consequentemente melhorar a qualidade e a vida útil de produtos alimentícios.

Tabela 3.8 – Espessuras (mm) e coeficientes de permeabilidade ao oxigênio (PO_2) de filmes de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato, no pH 11.

Concentração de ALG (%)	Espessura (mm)	$PO_2 \times 10^{16} (g \cdot (Pa \cdot s \cdot m)^{-1})$
0	$0,191 \pm 0,002$	$5,28 \pm 0,08^a$
0,25	$0,207 \pm 0,015$	$3,40 \pm 0,15^b$
0,5	$0,209 \pm 0,012$	$3,15 \pm 0,09^b$
0,75	$0,208 \pm 0,014$	$2,76 \pm 0,02^c$
1	$0,222 \pm 0,001$	$2,27 \pm 0,02^d$

*Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão)

**a,b,c Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

3.4 Conclusões

As diferentes concentrações de ALG (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) e os pHs analisados (6, 8 e 11) provocaram diferentes interações e conseqüentemente alterações nas propriedades dos filmes à base de SPI. A adição de ALG alterou o arranjo estrutural do filme de SPI, visualizado principalmente pela microscopia de superfície mais rugosa e heterogênea e pelas alterações nas intensidades das bandas dos espectros de FTIR. Os difratogramas de raio-X dos filmes SPI e SPI-ALG evidenciam sua estrutura amorfa, e apresentaram variações nos perfis em função da concentração de polissacarídeo e do pH, sendo que o pH mais básico (11) formou filmes com menor cristalinidade relativa.

Em relação a propriedades mecânicas, no geral, observou-se que, conforme o ALG foi sendo adicionado a filmes de SPI, a resistência à tração dos mesmos aumentou, nos três pHs avaliados (6, 8 e 11), e o pH 11 foi o que proporcionou maiores valores de tensão aos filmes de SPI (5%), em todas as concentrações de ALG.

Nos três pHs avaliados, filmes formados somente por SPI apresentaram opacidade estatisticamente menor em relação às misturas, o que foi atribuído à microestrutura mais lisa e uniforme desses filmes. De modo geral, a concentração crescente de ALG nos filmes de SPI aumentou a opacidade dos mesmos, cujo aumento significativo revelou-se desde a adição de apenas 0,25% de ALG, em todos os pHs.

O acréscimo de ALG a filmes de SPI aumentou a solubilidade dos mesmos. Em relação à PVA, de modo geral, as diferentes concentrações de ALG e diferentes pHs não alteraram significativamente suas médias. No entanto, filmes com 1% de ALG foram os que apresentaram maiores permeabilidades ao vapor de água, o que provavelmente se deve à natureza hidrofílica do alginato.

Através de isotermas de sorção observaram-se condições de estabilidade em ambientes de até 58% de umidade relativa. As isotermas foram bem descritas pelo modelo de GAB, e efeitos da concentração de ALG e do pH nos filmes de SPI influenciaram muito pouco a capacidade de sorção dos mesmos.

A concentração crescente de ALG nos filmes de SPI formados em pH 11 reduziu de maneira significativa a permeabilidade ao oxigênio dos mesmos, chegando a uma redução de 132% na formulação com 1% do polissacarídeo. Portanto, a adição de ALG aos filmes de SPI, no pH 11, pode aumentar a barreira ao oxigênio e melhorar, assim, a vida útil de produtos alimentícios revestidos ou embalados por esses filmes.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, S. JIMÉNEZ, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 135-143, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.015>.
- AMADO, L. R.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Effects of interactions between soy protein isolate and pectin on properties of soy protein-based films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, p. 48732 (1-9), 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.48732>.
- ANTONOVA, I.; MALLIKARJUNAN, P.; CHINNAN, M. S. In **Protein-Based Films and Coatings**, Edited by Gennadios, A. CRC Press: Boca Raton, 2002.
- A.O.A.C. In Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists; W. Horwitz, Ed.; A.O.A.C: Arlington, **1995**; Chapter 33.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM F 1927-14: **Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector**. Philadelphia, 2014.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM E96-95: **Standard test methods of water vapor transmission of materials**. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1995.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM D882-12, **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**, West Conshohocken, PA, 2012.
- BAGHERI, F.; RADI, M.; AMIRI, S. Drying conditions highly influence the characteristics of glycerol-plasticized alginate films. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 162-171, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.001>.
- BRANDELERO, R. P. H.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. The effect of surfactant Tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1102–1109, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.034>.
- BRANDENBURG, A. H.; WELLER, C. L.; TESTIN, R. F. Edible Films and Coatings from Soy Protein. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p. 1086-1089, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06120.x>.
- BRINDLE, L. P.; KROCHTA, J. M. Physical Properties of Whey Protein Hydroxypropylmethylcellulose Blend Edible Films. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 446-454, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00941.x>.
- CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p.1153-62, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.001>.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>.

CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 193-204, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.013>.

CHAE, S.; HEO, T. Production and properties of edible film using whey protein. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 2, p. 122-125, 1997.

CHAUX-GUTIÉRREZ, A. M., PÉREZ-MONTERROZA, E. J., MAURO, M. A. Rheological and structural characterization of gels from albumin and low methoxyl amidated pectin mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 60-68, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.025>.

CHO, S. Y.; PARK, J.; BATT, H. P.; THOMAS, R. L. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 418-423, 2007.

CLEMENTI, F. (1997) Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 327-361, 1997.

COLTELLI, M.; WILD, F.; BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LINDNER, M.; SCHMID, M.; WECKEL, V.; MÜLLE, K.; RODRIGUEZ, P.; STAEBLER, A.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; LAZZERI, A. State of the Art in the Development and Properties of Protein-Based Films and Coatings and Their Applicability to Cellulose Based Products: An Extensive Review. **Coatings**, v. 6, n. 1, p. 1-59, 2016.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Functional Properties of Myofibrillar Protein-based Biopackaging as Affected by Film Thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, 1996.

DENAVI, G.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R.; AÑÓN, M. C.; SOBRAL, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 341-349, 2009.

FREITAS, M. L. F., ALBANO, K. M., TELIS, V. R. N. Characterization of biopolymers and soy protein isolate-high-methoxyl pectin complex. **Polímeros**, v. 27, p. 62-67, 2017. DOI: 10.1590/0104-1428.2404.

GARRIDO, T.; ETXABIDE, A.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Characterization of agar/soy protein biocomposite films: Effect of agar on the extruded pellets and compression moulded films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 408-416, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.05.089.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T.H.; WELLE, C.L.; KROCHTA, J.M. Edible Coatings and Films Based on Proteins. In **Edible Coatings and Films to Improve Food Quality**, Edited by Krochta, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M. Chapter 9, pp 201-277. Lancaster: Technomic Publishing Co, 1994.

GONTARD, N.; THIBAUT, R.; CUQ, B.; GUILBERT, S. Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, 1064-1069, 1996.

GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 261–269, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.008>.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards. A. Physics and Chemistry**, v. 81A, n. 1, p. 89-96, 1977.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Preparation and characterization of antioxidante soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 13-21, 2018.

HAYAKAWA, K.; TANAKA, K.; NAKAMURA, T.; ENDO, S.; HOSHINO, T. Quality Characteristics of Waxy Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.): Properties of Starch Gelatinization and Retrogradation. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 576-580, 1997.

JIN, S.; LI, K.; XIA, C.; LI, J. Sodium alginate-assisted route to antimicrobial biopolymer film combined with aminoclay for enhanced mechanical behaviors. **Industrial Crops & Products**, v. 135, p. 271–282, 2019.

KAEWPRACHU, P.; RAWDKUEN, S. Mechanical and physico - chemical properties of biodegradable protein-based films: A comparative study. **Food and Applied Bioscience Journal**, v. 2, p. 15-30, 2014.

KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Development of aligned-hemp yarn-reinforced green composites with soy protein resin: Effect of pH on mechanical and interfacial properties. **Composites Science and Technology**, v. 71, p. 541–547, 2011.

KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Physical Properties of Biodegradable Films of Soy Protein Concentrate/Gelling Agent Blends. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 297, p. 176–183, 2012.

KITIC, D.; JARDIM, D. C. P.; FAVETTO, G. J.; RESNIK, S. L.; CHIRIFE, J. Theoretical Prediction of the Water Activity of Standard Saturated Salt Solutions at Various Temperatures. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 4, p. 1037-1041, 1986.

KOKOSZKA, S.; DEBEAUFORT, F.; HAMBLETON, A.; LENART, A.; VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 503-510, 2010.

KOSHY, R. R.; MARY, S. K.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A. Environment friendly green composites based on soy protein isolate – A review. **Food Hydrocolloids**, 50, 174 – 192, 2015.

KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A., NISPEROS-CARRIEDO, M. Chapter 9, pp 201-277. Lancaster: Technomic Publishing Co, 1994.

KUMAR, P.; SANDEEP, K. P.; ALAVI, S.; TRUONG, V. D.; GORGA, R. E. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 480–489, 2010.

LAM, M.; PAULSEN, P.; CORREDIG, M. Interactions of Soy Protein Fractions with High-Methoxyl Pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4726–4735, 2008.

LAROTONDA, F. D. S.; MATSUI, K. N.; SOBRAL, P. J. A.; LAURINDO, J. B. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 394–402, 2005.

LEWICKI, P. P. The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 32, p. 553–557, 1997.

LI, H.; ZHANG, X.; ZHAO, C.; ZHANG, H.; CHI, Y.; WANG, L.; ZHANG, H.; BAI, S.; ZHANG, X. Entrapment of curcumin in soy protein isolate using the pH-driven method: Nanoencapsulation and formation mechanism. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, p. 112480, 2022.

LI, S.; DONNER, E.; XIAO, H.; THOMPSON, M.; ZHANG, Y.; REMPEL, C.; LIU, Q. Preparation and characterization of soy protein films with a durable water resistance-adjustable and antimicrobial surface. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 947–955, 2016.

LI, X.; JIANG, F.; NI, X.; YAN, W.; FANG, Y.; CORKE, H.; XIAO, M. Preparation and characterization of konjac glucomannan and ethyl cellulose blend films. **Food Hydrocolloids** v. 44, p. 229–236, 2015.

MARQUARDT, D. W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, n. 2, p. 431–441, 1963.

MAURI, A. N.; AÑÓN, M. C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1064–1072, 2006.

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs Glycerol-Plasticized Whey Protein Edible Films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841–845, 1994.

MILLER, K. S.; KROCHTA, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 228–237, 1997.

MOLINA FILHO, L.; GONÇALVES, A. K. R.; MAURO, M. A.; FRASCARELI, E. C. Moisture sorption isotherms of fresh and blanched pumpkin (*Cucurbita moschata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 714–722, 2011.

OLIVEIRA, M. M. G.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Evaluation of Interactions Between Carboxymethylcellulose and Soy Protein Isolate and their Effects on the Preparation and Characterization of Composite Edible Films. **Food Biophysics**, v. 16, p. 214–228, 2021.

ORTIZ, C. M.; SALGADO, P. R.; DUFRESNE, A.; MAURI, A. N. Microfibrillated cellulose addition improved the physicochemical and bioactive properties of biodegradable films based on soy protein and clove essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 416-427, 2018.

OSÉS, J.; FABREGAT-VÁZQUEZ, M.; PEDROZA-ISLAS, R.; TOMÁS, S. A.; CRUZ-OREA, A. & MATÉ, J. I. Development and characterization of composite edible film based on whey protein isolate and mesquite gum. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 56-62, 2009.

OU, S.; KWOK, K. C.; KANG, Y. Changes in in vitro digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 301-305, 2004.

PAN, H.; XU, X.; TIAN, Y.; JIAO, A.; JIANG, B.; CHEN, J.; JIN, Z. Impact of phase separation of soy protein isolate/sodium alginate co-blending mixtures on gelation dynamics and gels properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 169-179, 2015.

PELEGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 77-80, 2005.

PEÑA-CHÁIDEZ, J. E.; ROSAS-FLORES, W.; SALAZAR-MONTOYA, J. A.; MORALES-CONTRERAS, B. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; MORALES-CASTRO, J.; MEDRANO-ROLDÁN, H. Rheological and thermal characterization of pinto saltillo bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates/sodium alginate gels. **LWT - Food Science and Technology**, v. 146, p. 111419, 2021.

PEREZ-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**, v. 66, n. 5, 2001.

PORTA, R.; DI PIERRO, P.; SABBAH, M.; REGALADO-GONZALES, C.; MARINIELLO, L.; KADIVAR, M.; ARABESTANI, A. Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 245-251, 2016.

PRANOTO, Y.; LEE, C. M.; PARK, H. J. Characterizations of fish gelatin films added with gellan and k-carrageenan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 766-774, 2007.

RAMOS, O. L.; REINAS, I.; SILVA, S. I.; FERNANDES, J. C.; CERQUEIRA, M. A.; PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A.; POÇAS, M. F.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 110-122, 2013.

ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G.; CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C. Filmes Compostos Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca e Proteína de Soja. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 24, n. 5, p. 587-595, 2014.

SHIGEMATSU, E.; RODRIGUES, H.; ARAÚJO, S. K.; MAGALHÃES, R. L. Estudo da vida útil de uvas minimamente processadas com cobertura à base de cera de abelha e alginato de sódio. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 12, p. 2663-2682, 2018.

SILVA, K. S.; FONSECA, T. M. R.; AMADO, L. R.; MAURO, M. A. Physicochemical and microstructural properties of whey protein isolate-based films with addition of pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 122-128, 2018.

SILVA, K. S.; MAURO, M. A.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. M. R. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 179-188, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.028>.

SOLIMAN, E. A.; TAWFIK, M. S.; EL-SAYED, H.; MOHARRAM, Y. G. Preparation and Characterization of Soy Protein Based Edible/Biodegradable Films. **American Journal of Food Technology**, v. 2, n. 6, p. 462-476, 2007.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Ecomaterials Based on Food Proteins and Polysaccharides. **Polymer Reviews**, v. 54, p. 514-571, 2014.

SUI, C.; ZHANG, W.; YE, F.; LIU, X. YU, G. Preparation, physical, and mechanical properties of soy protein isolate/ guar gum composite films prepared by solution casting. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, 2016.

SU, J.; HUANG, Z.; YUAN, X.; WANG, X.; LI, M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 145–153, 2010.

SUN, X. S. Thermal and Mechanical properties of soy proteins. In **Bio-Based Polymers and Composites**, Edited by Woll, R.; Sun, X. S. Chapter 9, pp. 292-326, 1st Edition, Academic Press, 2005.

TIAN, H.; GUO, G.; FU, X.; YAO, Y.; YUAN, L.; XIANG, A. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 475–490, 2018.

TONYALI, B.; CIKRIKCI, S.; OZTOP, M. H. Physicochemical and microstructural characterization of gum tragacanth added whey protein based films. **Food Research International**, v. 105, p. 1–9, 2018.

TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M. Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 583-591, 2001.

WANG, C.; NATALE, G.; VIRGILIO, N.; HEUZEY, M. Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 374-383, 2016.

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

WU, H.; LU, J.; XIAO, D.; YAN, Z.; LI, S.; LI, T.; WAN, X.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; SHEN, G.; LI, S.; LUO, Q. Development and characterization of antimicrobial protein films based on soybean protein isolate incorporating diatomite/thymol complex. **Food Hydrocolloids**, v. 110, p. 106138, 2021.

XIA, C.; WANG, L.; DONG, Y.; ZHANG, S.; SHI, S. Q.; CAI, L.; LI, J. Soy protein isolate-based films cross-linked by epoxidized soybean oil. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 82765-82771, 2015.

XIAO, Y.; LIU, Y.; KANG, S.; CUI, M.; XU, H. Development of pH-responsive antioxidant soy protein isolate films incorporated with cellulose nanocrystals and curcumin nanocapsules to monitor shrimp freshness. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106893, 2021.

XUE, F.; GU, Y.; WANG, Y.; LI, C.; ADHIKARI, B. Encapsulation of essential oil in emulsion based edible films prepared by soy protein isolate-gum acacia conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 178–189, 2019.

XU, F.; DONG, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, S.; LI, L.; LI, J. Preparation of cross-linked soy protein isolate-based environmentally-friendly films enhanced by PTGE and PAM. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 373–380, 2015.

YOO, S. R.; KROCHTA, J. M. Whey protein–polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, p. 2628-2636, 2011.

ZHANG, L.; ZHANG, F.; FANG, Y.; WANG, S. Alginate-shelled SPI nanoparticle for encapsulation of resveratrol with enhanced colloidal and chemical stability. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 313–320, 2019.

ZHENG, T.; YU, X.; PILLA, S. Mechanical and moisture sensitivity of fully bio-based dialdehyde carboxymethyl cellulose cross-linked soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1333-1340, 2017.

Capítulo 4

*Efeito da adição de alginato e de extrato de
beldroega (Portulaca oleracea L.) em filmes à
base de proteína isolada de soja*

4 EFEITO DA ADIÇÃO DE ALGINATO E DE EXTRATO DE BELDROEGA (*PORTULACA OLERACEA* L.) EM FILMES À BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

RESUMO

Portulaca oleracea L. pode ser considerada uma planta daninha, porém comestível e rica em compostos bioativos, sendo seu extrato uma alternativa de antioxidante natural para ser incorporado em filmes biodegradáveis, visando aprimorar suas propriedades. Filmes biodegradáveis à base de isolado proteico de soja (SPI) (5% m/m solução filmogênica) foram formulados sem e com adição de alginato de sódio (ALG) (1% m/m de solução filmogênica) e ambos os filmes (SPI e SPI-ALG) tiveram adição de diferentes concentrações de extrato de *Portulaca oleracea* L. (EB) (0, 2,5; 3,75 e 5% m/m de solução filmogênica). Efeitos do ALG e do EB sobre as propriedades dos filmes foram avaliados por análises de espectroscopia de infravermelho (FTIR), Raio X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), propriedades mecânicas e óticas, permeabilidade ao vapor de água, umidade, solubilidade e atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados indicaram que a adição de EB provoca diferentes comportamentos, dependendo da matriz polimérica em que é aplicado. Adição de EB aos filmes simples (SPI) reduziu a tensão e a elongação na concentração de 2,5% EB e reduziu a opacidade em todas as concentrações analisadas, enquanto sua adição aos filmes compostos (SPI-ALG) melhorou significativamente ($p < 0,05$) as propriedades mecânicas e de barreira à luz, em todas as concentrações de EB. A solubilidade aumentou com a presença de ALG mas não sofreu alteração com a adição de EB, enquanto a permeabilidade ao vapor de água aumentou significativamente apenas no filme SPI-5% EB, quando ALG foi adicionado e o filme foi exposto a uma faixa alta de umidade relativa (UR). A atividade antioxidante de ambos os filmes foi significativamente melhorada ($p < 0,05$) com a presença do EB na menor concentração (2,5%), não apresentando diferença significativa em praticamente todos os filmes com concentrações maiores (3,75 e 5%). Filmes com ALG apresentaram atividade antioxidante inferior aos filmes sem o polissacarídeo, enquanto excelentes propriedades mecânicas e de barreira à luz foram atribuídas à presença do ALG, independentemente da presença do EB nos filmes compostos (SPI-ALG). Portanto, a adição do polissacarídeo e do extrato vegetal pode proporcionar filmes biodegradáveis com potencial para diferentes aplicações, tanto na forma de revestimento como de embalagem de alimentos.

4.1 Introdução

Polímeros naturais (proteínas e polissacarídeos) são considerados recursos abundantes, renováveis, de baixo custo e biodegradáveis, sendo vistos, portanto, como uma ótima alternativa para substituir ou pelo menos reduzir o uso de materiais não renováveis e não biodegradáveis em embalagens (CHANG-BRAVO; LÓPEZ-CÓRDOBA; MARTINO, 2014). Além disso, embalagens biodegradáveis apresentam elevado potencial para carrear e/ou liberar substâncias ativas, como compostos antioxidantes, e prevenir a degradação oxidativa dos alimentos embalados (CRIZEL et al., 2018; RANGARAJ et al., 2021; ROJAS-GRAÜ; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2009).

Entre os materiais utilizados para elaboração de filmes comestíveis (proteínas, polissacarídeos e lipídeos), as proteínas parecem ser as mais atraentes, uma vez que seus filmes possibilitam uma melhor barreira ao oxigênio quando comparados aos de polissacarídeos e/ou lipídeos, especialmente em baixas umidades, pois apresentam melhores propriedades mecânicas devido à sua estrutura específica que possui alto potencial para ligações intermoleculares, além de fornecerem valor nutricional quando ingeridos (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1998; OU et al., 2004; CAO; FU; HE, 2007). A proteína de soja vem sendo muito estudada para elaboração de filmes comestíveis, uma vez que é abundante, de baixo custo, nutritiva e apresenta capacidade razoável para formação de filme (RANI et al., 2021; TIAN et al., 2018). A SPI é obtida da farinha desengordurada de soja e possui na sua composição mais de 90% de proteína, composta de uma mistura de albuminas e globulinas (2S, 7S, 11S e 15S). As globulinas presentes em maior quantidade são a 7S (35%) e 11S (52%), sendo a polimerização dessas frações via ligações dissulfeto a principal responsável pela formação do filme (TIAN et al., 2018). No entanto, filmes comestíveis à base de SPI enfrentam alguns desafios, como baixa resistência mecânica, menor barreira ao oxigênio, alta absorção de água e baixa atividade antioxidante quando comparados aos de outras proteínas vegetais (RANI et al., 2021).

Uma alternativa que vem se mostrando promissora na área de filmes biodegradáveis é a combinação de proteínas e polissacarídeos, que quando combinados em quantidades e condições adequadas, podem proporcionar características específicas e mais vantajosas para os filmes (SILVA et al., 2018, AMADO; SILVA; MAURO, 2020; OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021). Além disso, sabe-se que o SPI apresenta caráter anfifílico, o qual favorece interações com polissacarídeos (OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021). Melhorias nas características de filmes de SPI já foram observadas com adição de pectina (AMADO; SILVA; MAURO, 2020)

e carboximetilcelulose (OLIVEIRA; SILVA; MAURO, 2021), por exemplo, em que as autoras encontraram aumento da tensão e redução da permeabilidade ao oxigênio com a adição desses polissacarídeos.

Alginate de sódio é um polissacarídeo muito utilizado na indústria biomédica e alimentícia, e tem sido extensivamente estudado para elaboração de filmes e coberturas, devido, sobretudo, ao seu baixo custo, à ausência de toxicidade e por ser biodegradável (JIN et al., 2019; RHIM, 2004). O ALG é extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*) com soluções aquosas alcalinas. Em termos moleculares é um polímero composto de monômeros de ácido β -D-manurônico e resíduos de α -L-ácido gulurônico unidos por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) (LEE; MOONEY, 2012).

Outra alternativa que pode melhorar as características dos filmes comestíveis é a adição de antioxidantes naturais durante a elaboração dos mesmos pois, além de adicionar compostos nutritivos, pode inibir reações de degradação, aumentando, assim a vida útil dos alimentos a serem embalados. Nos últimos anos vários estudos sobre a influência de antioxidantes naturais, como ácido caféico, catequina, quercetina e extratos vegetais em filmes biodegradáveis, vêm sendo conduzidos (SANCHES-SILVA et al., 2014; RANGARAJ et al., 2021). Em filmes à base de SPI, especificamente, encontram-se estudos sobre incorporação de ácidos fenólicos (ácido caféico e ácido ferúlico) (KANG et al., 2016; LI et al., 2021), flavonoides (rutina, epicatequina e procianidina) (FRIESEN; CHANG; NICKERSON, 2015; ZOU et al., 2019) e extratos polifenólicos (como de semente de uva, de resíduo de alcaçuz e de caroço de manga) (MARYAM ADILAH; JAMILAH; NUR HANANI, 2018; CIANNAMEA; ROXANA; RUSECKAITE, 2016; HAN; YU; WANG, 2018).

Entre os extratos vegetais se encontra o extrato proveniente da beldroega (*Portulaca oleracea* L.), em que muitas pesquisas têm reportado a presença de importantes antioxidantes naturais. *Portulaca oleracea* L., um membro da Família Portulacaceae, é uma erva daninha e suculenta cultivada em praticamente todo o mundo; possui rápido crescimento e é adaptável a diferentes condições de solo e clima (BLÁZQUEZ; CARBÓ, 2015). A beldroega tem sido utilizada mundialmente como um alimento saudável e para fins medicinais, e muitos efeitos benéficos de seu consumo têm sido observados, como prevenção de doenças neurodegenerativas, diabetes e suas complicações, insuficiência respiratória, doenças hepáticas, doenças gastrointestinais e insuficiência renal (FARKHONDEH; SAMARGHANDIAN, 2019). Isso ocorre devido à presença de diversos fitoquímicos, como alcaloides, fenóis, cumarinas, terpenóides e flavonoides (Kaempferol, apigenina, luteolina, miricetina e quercetina), sendo os últimos os principais constituintes (FARKHONDEH;

SAMARGHANDIAN, 2019; LIU et al., 2000; SARATALE et al., 2020). Além disso, as folhas de beldroega são ricas em carotenos, ácido ascórbico, além de ser rica fonte de ácidos graxos, principalmente ácidos graxos ômega-3 (SIMOPOULOS et al., 1992; GARTI; SLAVIN; ASERIN, 1999; LIU et al., 2000; PETROPOULOS et al., 2015). Dentre as pesquisas com a utilização da beldroega encontra-se sua aplicação para preservação de carne de porco resfriada (FAN et al., 2019) e para enriquecer massa de macarrão (MELILLI et al., 2020). No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos em que seu extrato foi adicionado com a finalidade de melhorar propriedades de filmes comestíveis.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi elaborar filmes de SPI (5%) e SPI (5%) + ALG (1%) e avaliar a influência do alginato e de diferentes concentrações de extrato de beldroega (*Portulaca oleracea* L.) sobre as propriedades estruturais (FTIR, Raio-X e MEV), propriedades mecânicas e óticas, umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e sobre a atividade antioxidante dos filmes.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Isolado proteico de soja (SPI) com teor de proteína de 91,14% (base seca), de cinzas 5,2% (base úmida) e de umidade 6,41% (base úmida) foi adquirida da empresa Ecil Ingredientes (São Paulo, Brasil), alginato de sódio (viscosidade 470 mPa·s) (GRINDSTED[®] Alginate FD 175) foi doado pela Danisco Brasil Ltda e glicerol bidestilado foi adquirido da Synth. Para a quantificação da atividade antioxidante utilizou-se o 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (TROLOX) da marca Sigma e 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) da Chemicals.

4.2.2 Extrato de beldroega

Amostras de beldroegas espontâneas (Figura 4.1a) foram colhidas na região de Fernando Prestes (S 21°16'55.6" W 48°41'25.3") em quantidade suficiente para realizar toda a pesquisa a partir do mesmo lote de matéria prima. A espécie foi identificada pela Dra. Daniela Sampaio Silveira em uma cópia de comprovante (número SJRP34410) depositado no herbário SJRP do IBILCE/UNESP, em São José do Rio Preto, São Paulo. As folhas foram destacadas, lavadas com água corrente e secas em estufa a vácuo (TE-395, Tecnal, Brasil) (Figura 4.1b), a

40 °C e 10 kPa, até teor de água de $22,25 \pm 0,19$ % em base úmida e, a seguir, foram trituradas em liquidificador (Mandine, Brasil) (Figura 4.1c).

Figura 4.1 – Etapas para obtenção da beldroega seca e triturada.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para obtenção do extrato de beldroega utilizou-se procedimento de Fan et al. (2019) com modificações. As folhas secas e trituradas foram pesadas em tubos de polipropileno de 50 mL utilizando balança analítica (AUY220, Shimadzu, Filipinas) e homogeneizadas com solução hidroetanólica (80% álcool etílico) durante 1 min à velocidade de 15.000 rpm em homogeneizador Turratrec (TE-102, Tecnal, Brasil). A proporção folha:solução extratora foi de 1:6 (m/v). Os tubos foram então levados a um banho de ultrassom (Q3.0/40A, Ultronique, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, foram colocados em uma centrífuga (Z326K, Hermle, Alemanha) a 7.500 rpm por 25 min, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -18 °C até o momento de ser utilizado.

4.2.3 Elaboração dos filmes

SPI foi disperso em água destilada para obter uma solução estoque com concentração de 9% (m/m). Para sua dissolução, o pH foi ajustado para 11 com NaOH (40%) utilizando-se pHmetro da marca TecnoPON (MPA 210, Brasil) e a solução foi aquecida em banho termostático (Simétrica, SI/6Aneis/18L, Brasil) a 65 °C por 10 min. ALG foi disperso em água destilada para obter uma solução estoque com concentração de 3% (m/m) e foi aquecido à temperatura de 70 °C até sua dissolução. As soluções foram resfriadas e armazenadas em câmara de climatização BOD (BT 71/ Biothec, Brasil) sob refrigeração (4 °C) para serem utilizadas no dia seguinte.

Para elaboração dos filmes, no caso dos filmes SPI (5%) e SPI (5%)-ALG (1%), seguiu-se o mesmo procedimento do Capítulo 3 (item 3.2.2). Quantidades apropriadas de soluções-estoque e água destilada foram adicionadas para obtenção da concentração desejada, 5% SPI (m/m solução filmogênica) e 1% ALG (m/m solução filmogênica). Adicionou-se também, como plastificante, glicerol na concentração de 2% (m/m solução filmogênica) (40% em massa da proteína) e 20 mM de NaCl (a partir de solução aquosa a 20% m/v). No caso dos filmes com adição de EB, a massa de extrato etanólico que seria adicionada foi descontada da quantidade de água destilada, mas o EB não foi adicionado nessa etapa de preparação das soluções filmogênicas. A seguir, as soluções filmogênicas permaneceram em agitação por cerca de 3 h, tiveram seus pHs ajustados para 11 com NaOH (40% m/m), foram aquecidas a 70 °C por 20 min em banho termostático (Simétrica, SI/6Aneis/18L, Brasil) e então, deixadas resfriar em temperatura ambiente.

Para os filmes com adição de extrato de beldroega (EB), este foi acrescentado após resfriamento da solução filmogênica final. O volume de extrato em etanol sempre foi o mesmo, independentemente das diferentes concentrações utilizadas (2,5; 3,75 e 5%), uma vez que para os filmes com menores concentrações, o extrato foi diluído em álcool etílico antes de ser adicionado às soluções filmogênicas. Após a adição do extrato, as soluções foram agitadas por 15 min.

Todas as soluções filmogênicas (140 g para soluções somente de SPI e 135 g para mistura SPI-ALG) foram despejadas em suportes de polietileno (26,5 × 17,5 cm) e foram secas a 35 °C por aproximadamente 24 h em câmara de climatização BOD (BT 71/ Biothec, Brasil), sendo a quantidade de solução na bandeja determinada após testes preliminares de espessura do filme. Após a secagem, os filmes foram removidos e armazenados por uma semana em dessecadores com umidade relativa controlada por solução saturada de nitrato de magnésio (umidade relativa de 53%), antes de proceder às análises.

4.2.4 Caracterização dos filmes

4.2.4.1 Espessura

Medidas de espessura são importantes para a caracterização dos filmes e, sobretudo, para a determinação de suas propriedades mecânicas, óticas e de barreira. Estas foram realizadas utilizando um micrômetro digital (MDC-25SB, Mitutoyo, Japão) em diferentes pontos de cada filme.

4.2.4.2 Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Nesta análise, o extrato de beldroega em solução hidroetanólica a 80% foi levado a um evaporador rotativo (Tecnal, TE-211, Brasil) para eliminação do álcool e, em seguida, congelado para posterior liofilização em liofilizador Liobras (Liobras, L101, Brasil) por cerca de 20 h. As matérias-primas (SPI, ALG e EB liofilizado) e os filmes foram analisados utilizando um Espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Bruker, Vertex 70, Alemanha), através da técnica de reflectância total atenuada (ATR), sendo obtidos 64 espectros com resolução de 4 cm^{-1} de cada amostra.

4.2.4.3 Difração de Raios X (DRX)

A análise de Difração de Raios-X em Alto Ângulo (WAXS – Wide Angle X-Ray Scattering) dos pós de SPI e ALG, e dos filmes sem e com diferentes concentrações de extrato de beldroega foi realizada utilizando-se um difratômetro de bancada (Rigaku, RINT 2000, Japão). O equipamento operou com voltagem de 50 kV e corrente de 30 mA, usando radiação de Cu, linha K, $L = 1,542\text{ \AA}$. Os difratogramas foram determinados entre os ângulos de 5° e 60° , a uma velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$. A cristalinidade relativa foi quantitativamente estimada, em triplicata, pela relação entre a área cristalina (área dos picos) e área total dos difratogramas, segundo método de Hayakawa et al. (1997).

4.2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura superficial e transversal dos filmes sem e com extrato de beldroega foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente armazenadas em sílica por 15 dias para remoção da umidade. Para obtenção das imagens as amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio com fita de carbono e recobertas por uma fina camada de ouro, sob vácuo, por 2 minutos. As imagens foram analisadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (FEG-MEV JEOL – JSM7500F, Alemanha), operando com uma tensão de aceleração de elétrons de 2 kV.

4.2.4.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis (tensão, elongação na ruptura e módulo de Young) foram analisadas seguindo método padrão estabelecido pela ASTM D882-12 (ASTM D882-12, 2012). A análise foi realizada em um texturômetro (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) utilizando 10 corpos de prova de cada formulação, que foram cortados em formato retangular ($70\text{ mm} \times 25\text{ mm}$) e colocados entre as garras dos *probes*,

ficando com uma dimensão inicial para análise de 50 mm × 25 mm. A velocidade de teste foi fixada em 0,8 mm·s⁻¹ e os dados foram processados com auxílio do software EXPONENT, versão 5.1.1.0.

4.2.4.6 Propriedades óticas

A opacidade e parâmetros de cor (L*, a* e b*) foram determinados em espectrofotômetro de bancada (HunterLab, ColorFlex, Estados Unidos). As amostras foram cortadas em formato circular e acomodadas na abertura do espectrofotômetro previamente calibrado. As análises foram realizadas em triplicata e, para cada amostra, foram registrados valores para quatro diferentes posições, ficando com 12 leituras finais.

A transmitância dos filmes foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA) na faixa do comprimento de onda da luz visível, de 200 a 800 nm, para quatro diferentes corpos de prova de cada formulação, que foram cortados em retângulos de 2,5 × 1,0 cm.

4.2.4.7 Teor de água

Sólidos totais dos filmes foram determinados, em triplicata, após os filmes serem armazenados a 53% UR e 25 °C. A análise foi realizada pelo método gravimétrico, em estufa a vácuo (TE-395, Tecnal, Brasil) a 60 °C e 10 kPa, até atingir massa constante (AOAC, 1995).

4.2.4.8 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada, em triplicata, de acordo com Cuq et al. (1996). Os filmes (círculos com 2 cm de diâmetro) foram secos até massa constante em estufa a vácuo a 60 °C (TE- 395, Tecnal, Brasil) e 10 kPa. Em seguida foram imersos em 50 mL de água destilada e armazenados em uma câmara de climatização BOD (MA 830/A, Marconi, Brasil) à temperatura de 25 °C e agitação de 60 rpm por 24 h. Por fim, as amostras foram retiradas da água e secas novamente a 60 °C em estufa a vácuo até massa constante. A solubilidade foi calculada como a relação entre a matéria seca final e inicial.

4.2.4.9 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes de SPI e SPI+ALG, ambos sem e com adição de diferentes concentrações de extrato, foi determinada, em triplicata, seguindo o método gravimétrico ASTM E96-95 (ASTM E96-95, 1995). As amostras dos filmes, com espessura previamente determinada, foram submetidas a dois gradientes de umidade relativa.

Em um deles (2% UR – 100% UR), as amostras foram colocadas em células de difusão parcialmente preenchidas com CaCl_2 anidro (2% UR), as quais foram dispostas no interior de dessecadores contendo água destilada (100% UR). Um segundo gradiente (64,5% UR – 90% UR) foi criado com uma solução saturada de NaNO_2 (64,5% UR) no interior das células, que foram dispostas em dessecadores com BaCl_2 (90% UR). Os dessecadores foram levados a uma câmara de climatização BOD (BT 71, Biothec, Brasil) a 25 °C e as células foram pesadas em intervalos de 1 h durante 8 h. Determinou-se o ganho de massa de água em balança analítica (BEL Engineering, UMark 250 A, Itália). Cápsula e dessecadores com ventoinha para homogeneizar rapidamente a fase gasosa no seu interior são mostrados no Capítulo 3 (Figura 3.3).

A determinação da PVA foi realizada em triplicata e calculada em $\text{g} \cdot (\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})^{-1}$, utilizando a Equação 4.1.

$$\text{PVA} = \frac{\text{TPVA} \cdot e}{A \cdot p_s \cdot ((\text{URE}_1 - \text{URE}_2)/100)} \quad (4.1)$$

em que: TPVA representa a taxa de permeabilidade ao vapor de água, em $\text{g} \cdot \text{água} \cdot \text{s}^{-1}$; e é a espessura média dos filmes, em m; A é a área de permeação da cápsula ($28,14 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$); p_s é pressão de saturação do vapor de água a 25 °C (3169 Pa); URE é a umidade relativa de equilíbrio no interior do dessecador (sub índice 1) e no interior da cápsula (sub índice 2).

4.2.4.10 Determinação da capacidade antioxidante dos filmes

4.2.4.10.1 Extração dos compostos bioativos

A extração dos compostos bioativos dos filmes biodegradáveis sem e com adição de EB foi realizada de maneira similar ao realizado com as folhas da beldroega. Primeiramente os filmes foram cortados em pedaços pequenos e pesaram-se amostras de 3g de cada filme. Em seguida, acrescentou-se 13,5 mL de solução extratora (álcool etílico 80%) às amostras de filmes sem extrato (proporção 1:5 m/v) e 27 mL da mesma solução aos filmes com adição de extrato (proporção 1:10 m/v). A mistura foi agitada em homogeneizador Turrtec (TE-102, Tecnal, Brasil) durante 1 min à velocidade de 15.000 rpm e, em seguida, levada a um banho de ultrassom (Q3.0/40A, Ultronique, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente (25 °C). Por fim, os frascos foram dispostos em centrífuga (Z326K, Hermle, Alemanha), centrifugados a 7.500 rpm por 25 min a 4 °C e os sobrenadantes coletados e armazenados a -18 °C para posterior

avaliação quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH. As extrações dos compostos bioativos foram realizadas em triplicata.

4.2.4.10.2 Determinação da atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante total dos filmes sem e com adição de extrato foi determinada por meio do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A atividade antioxidante foi quantificada usando curva de calibração preparada com solução padrão de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e a leitura de absorbância foi realizada a 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, GENESYS 10S UV-VIS, EUA). A atividade antioxidante total de cada extrato foi realizada em triplicata e a média expressa em μmol de trolox $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de filme.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ao nível de significância de 0,05, utilizando software Minitab® 16.2.0.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 FTIR

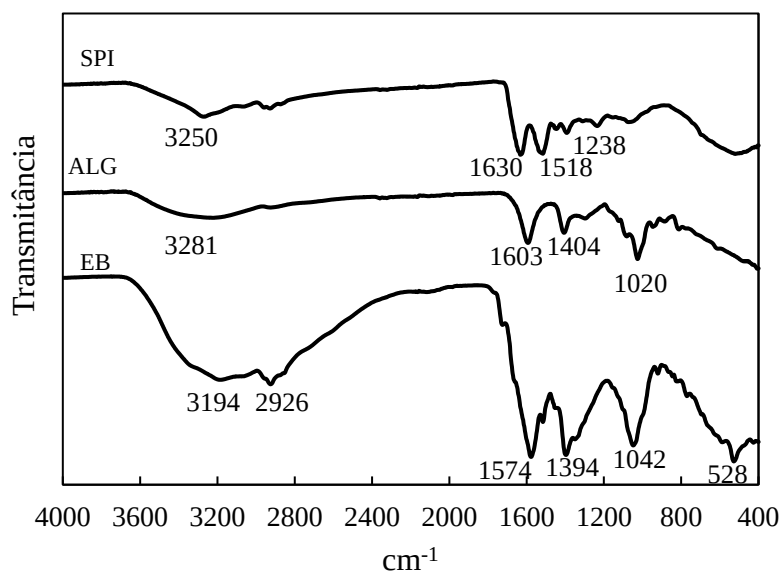
Com o objetivo de investigar as estruturas moleculares e possíveis interações entre SPI, ALG e/ou EB, foram realizadas análises por FTIR dos pós desses materiais e dos filmes. Os espectros de infravermelho dos pós de SPI e ALG e do EB, este último após ser submetido a rotoevaporação e liofilização, estão apresentados na Figura 4.2, e dos filmes na Figura 4.3.

As três matérias-primas utilizadas apresentaram uma banda larga na faixa 3300-3000 cm^{-1} , relacionada ao estiramento O-H, o que indica potencial para interações de hidrogênio intermoleculares entre grupos hidroxila ou entre grupos hidroxila e grupos amino (GARRIDO et al., 2016). Além dessa banda, o espectro da SPI em pó (Figura 4.2) exibiu três picos característicos comuns às proteínas, em 1630, 1518 e 1238 cm^{-1} , que podem ser atribuídos à amida I (estiramento C=O), à amida II (dobramento N-H) e à amida III (estiramento C-H e N-H), respectivamente (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014; GARRIDO et al., 2016; LI et al., 2016). No caso do ALG em pó, seu espectro exibiu picos principais em 1603, 1404 e 1020 cm^{-1} . As bandas de absorção em 1603 e 1404 cm^{-1} possivelmente representam

frequências vibracionais de estiramento simétricas e assimétricas de ácidos carboxílicos do alginato (JIN et al., 2019). A banda em 1020 cm^{-1} , por sua vez, pode corresponder a vibrações de estiramento C-O, características de polissacarídeos, que foram relacionadas à banda em 1042 cm^{-1} observada em alginato por Jin et al. (2019).

No espectro do EB também foi possível identificar os seguintes picos: 2926, 1574, 1394, 1042 e 528 cm^{-1} . O pico em 2926 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H (EL-DESOUKY, 2021; SAMPRASIT et al., 2020). O pico em 1574 cm^{-1} provavelmente está associado às ligações C=C de grupos aromáticos pertencentes aos compostos fenólicos de extratos vegetais (WANG et., 2016; SILVA et al, 2021). A banda em 1394 cm^{-1} provavelmente se refere ao dobramento –C–H do grupo metil (CH_3), observado por Sodeifian et al. (2018) em comprimento de absorção de 1375 cm^{-1} . A banda em 1042 cm^{-1} possivelmente corresponde ao estiramento do grupo S=O (EL-DESOUKY, 2021). El-Desouky (2021) identificou as bandas do extrato aquoso de *Portulaca oleracea* e encontrou esse grupo funcional em $1044,26\text{ cm}^{-1}$. Por fim, a banda determinada em 528 cm^{-1} pode estar relacionada ao estiramento C-I, observado por El-Desouky (2021) na posição $535,15\text{ cm}^{-1}$. Sodeifian et al. (2018) determinaram o conteúdo de iodo em amostra de óleo da semente de beldroega (aproximadamente $138\text{ g de I}_2 / 100\text{ g de óleo}$) e destacou que o grande conteúdo de iodo encontrado pode indicar abundância de ácido graxo insaturado.

Figura 4.2 – Espectro de FTIR da SPI em pó, ALG em pó e EB liofilizada.



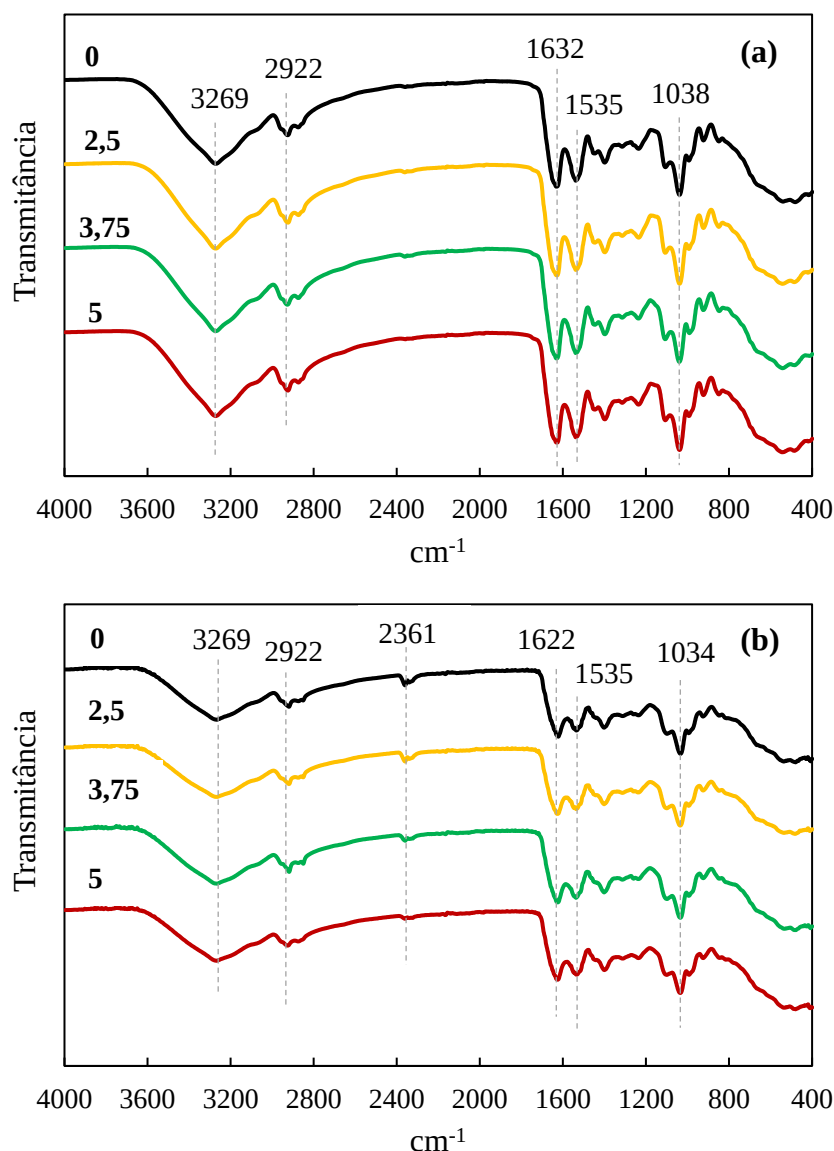
Fonte: Elaborado pelo autor

Na Figura 4.3 estão apresentados os espectros dos filmes de SPI (a) e SPI-ALG (b), ambos sem e com adição de diferentes concentrações de EB. Nota-se que todos os filmes tiveram espectros semelhantes, com alterações mais pronunciadas na intensidade das bandas com o acréscimo do ALG, que também levou a um pequeno deslocamento dos picos em 1632 e 1038 cm^{-1} e surgimento de um pico em 2361 cm^{-1} .

Comparando o espectro dos filmes de SPI (Figura 4.3a) com o da SPI em pó (Figura 4.2) observou-se aparecimento de alguns picos, dentre eles a banda em 1038 cm^{-1} , que pode corresponder à interação de hidrogênio entre moléculas de SPI e glicerol (BERGO; SOBRAL, 2007; LI et al., 2016). A adição do EB, que apresenta bandas características distintas (Figura 4.2), não alterou significativamente o espectro do filme de SPI, independentemente da concentração empregada. A similaridade entre os espectros sugere que não houve interação entre grupos funcionais do extrato e da SPI, o que provavelmente foi causado pela baixa concentração de extrato vegetal na matriz polimérica, assim como verificado por Silva et al. (2021) com adição de extrato de *Caesalpinia ferrea Martius* em filmes de poli(álcool vinílico) (PVA).

Nos filmes à base de SPI-ALG (Figura 4.3b) notou-se que o EB provocou pequena mudança de intensidade na banda 2361 cm^{-1} , que foi reduzida com adição de EB e com o aumento de sua concentração no filme. No entanto, tanto para os filmes à base de SPI (Figura 4.3a) quanto de SPI-ALG (Figura 4.3b), nenhuma ligação química foi verificada após adição de extrato vegetal. Os resultados indicam que nas concentrações utilizadas de EB não houve interação química, sendo esperadas somente interações de hidrogênio entre os grupos funcionais dos filmes de SPI e SPI-ALG com os compostos bioativos do extrato (HAN et al., 2018; MAIZURA et al., 2007).

Figura 4.3 – Espectro de FTIR dos filmes elaborados com SPI e EB em diferentes concentrações, em % (a) e SPI-ALG com EB nas mesmas concentrações (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2 Microestrutura

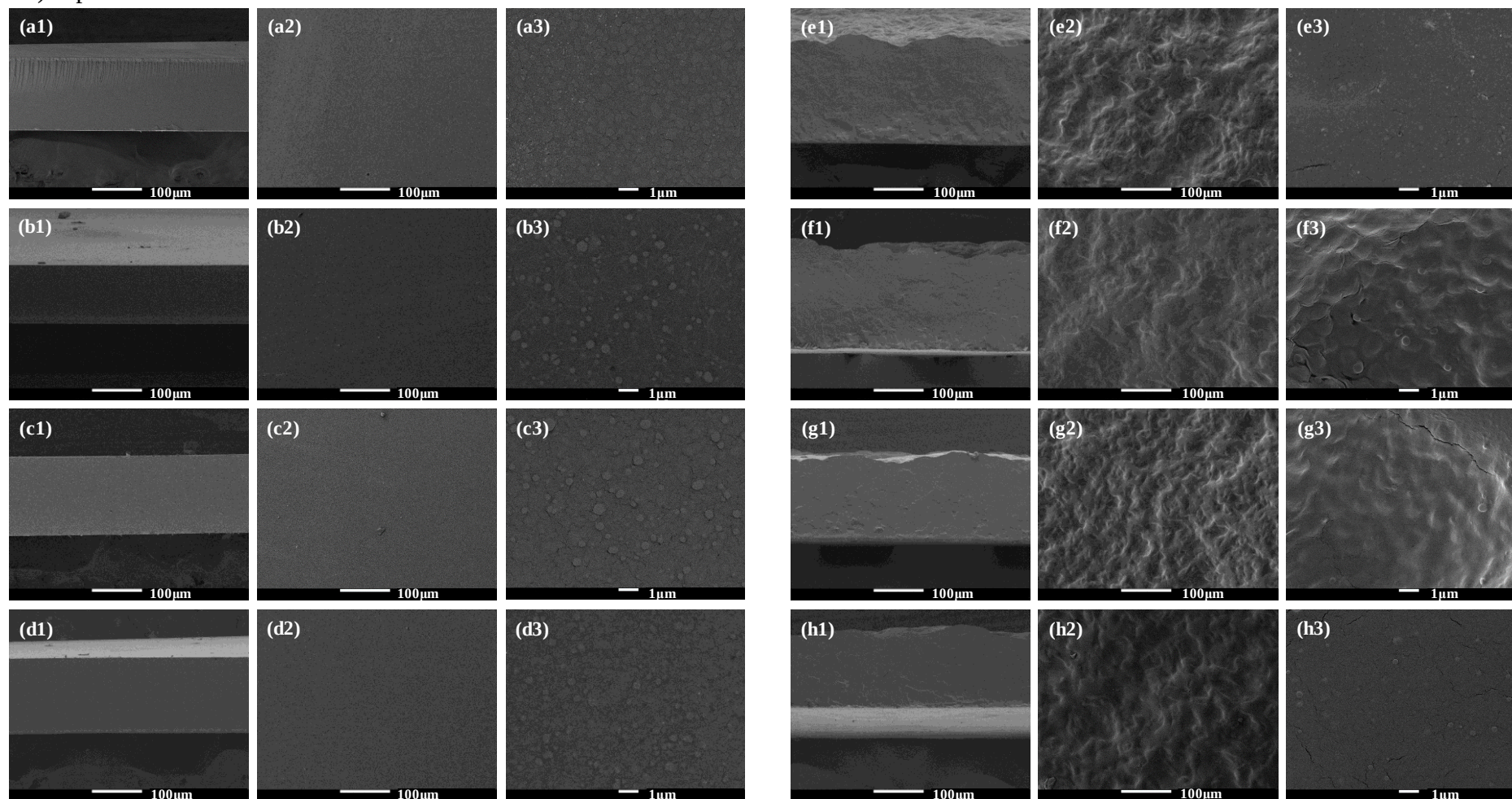
A micrografia do filme de SPI (Figura 4.4) demonstra que esse filme possui uma estrutura transversal e superficial lisa, sem rachaduras ou rugosidade, compacta, coesa e sem poros. Na Figura 4.4e verifica-se que a adição de ALG tornou a estrutura do filme de SPI mais rugosa e com presença de aglomerados, havendo regiões mais elevadas que outras, o que pode caracterizar heterogeneidade na distribuição superficial da estrutura proteica e do alginato, com possível excesso de polissacarídeo em algumas regiões. A superfície do filme no aumento de 10.000× (Figura 4.4e3), no entanto, mostra grandes zonas de continuidade, provavelmente

resultado da alta concentração de ALG (1%) em relação à de SPI (5%) na solução filmogênica estudada.

A adição de diferentes concentrações de EB ao filme simples (SPI) e composto (SPI-ALG) influenciou a microestrutura dos filmes. Nos filmes à base de SPI observa-se presença de estruturas redondas em relevo, visíveis no aumento de 10.000 $\times$ (Figuras 4.4b3-4.4d3), sendo a maior quantidade dessas estruturas notada no filme 2,5% EB (Figura 4.4b). Conforme aumenta-se a concentração de EB, uma redução dessas estruturas pode ser observada, e o filme 5% EB (Figura 4.4d) pode ser considerado o mais homogêneo. A incorporação do EB aos filmes de SPI-ALG (Figuras 4.4f-h), por sua vez, influenciou de formas diferentes a microestrutura, dependendo da concentração de EB. Nas concentrações 2,5 e 3,75% EB verifica-se, no aumento 10.000 $\times$ (Figuras 4.4f3 e 4.4g3), uma estrutura rugosa e com presença de aglomerados. No entanto, com adição de 5% EB a estrutura do filme tornou-se mais lisa e homogênea (Figura 4.4h3), sugerindo que houve uma boa dispersão entre a matriz do filme SPI-ALG e o extrato de beldroega (EB) nessa concentração.

Vale ressaltar que nas micrografias dos filmes à base de SPI-ALG (Figuras 4.4e3-4.4f3) as fissuras observadas provavelmente são devido ao processo de metalização que ocorre na preparação das amostras para análise ou ao tempo de exposição ao feixe de elétrons de alta energia (JIMÉNEZ et al., 2012; SILVA et al., 2020).

Figura 4.4 – Microestrutura dos filmes elaborados com SPI (5%) e EB em diferentes concentrações: (a-d) 0; 2,5; 3,75 e 5%, respectivamente; e SPI (5%) + ALG (1%) com EB nas mesmas concentrações (e-h) 0; 2,5; 3,75 e 5%, respectivamente; 1) transversal de 250 $\times$; 2) superfície de 250 $\times$; e 3) superfície de 10.000 $\times$.



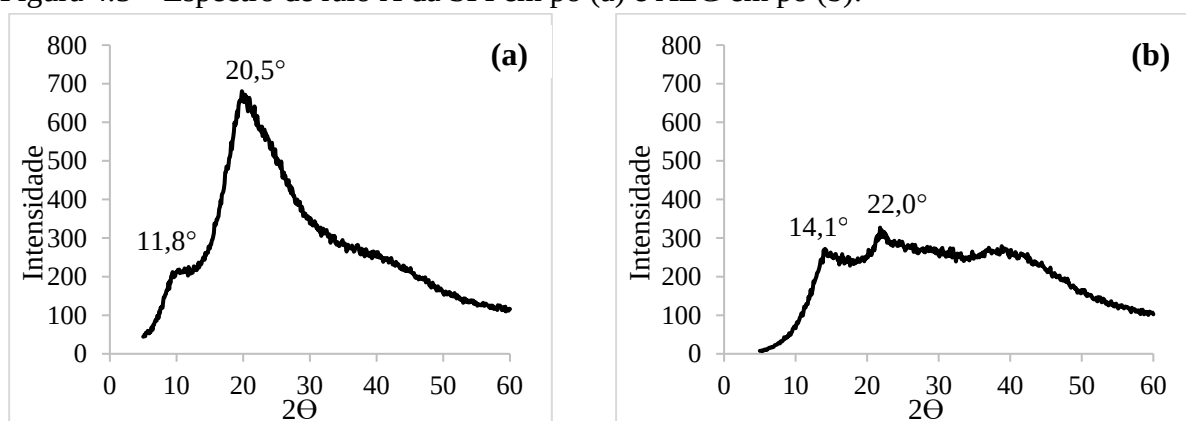
Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.3 Difração de Raios X (DRX) e cristalinidade relativa

Os difratogramas de raios-X das matérias-primas em pó (SPI e ALG) e filmes biodegradáveis (controle e adicionados de EB) estão apresentados nas Figura 4.5 e 4.6, respectivamente.

Os perfis obtidos para as matérias-primas são característicos de estruturas com baixo grau de cristalinidade. SPI em pó apresentou um pico discreto, em $2\theta \approx 11,8^\circ$, e outro mais amplo em $2\theta \approx 20,5^\circ$ (Figura 4.5a). Os dois picos encontrados podem ser atribuídos, respectivamente, a α -hélice e a folha- β da estrutura secundária da SPI (CHEN et al., 2013; HUO et al., 2019). ALG em pó apresentou estrutura predominante amorfa com dois picos de cristalinidade ($2\theta = 14,1^\circ$ e $2\theta = 22,0^\circ$) (Figura 4.5b). Esses dois principais picos cristalinos no ALG foram também reportados por Larosa et al. (2018).

Figura 4.5 – Espectro de raio X da SPI em pó (a) e ALG em pó (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os difratogramas dos filmes baseados em SPI e SPI-ALG sem e com diferentes concentrações de EB exibiram perfis de material com baixo grau de cristalinidade para todas as formulações (Figura 4.6).

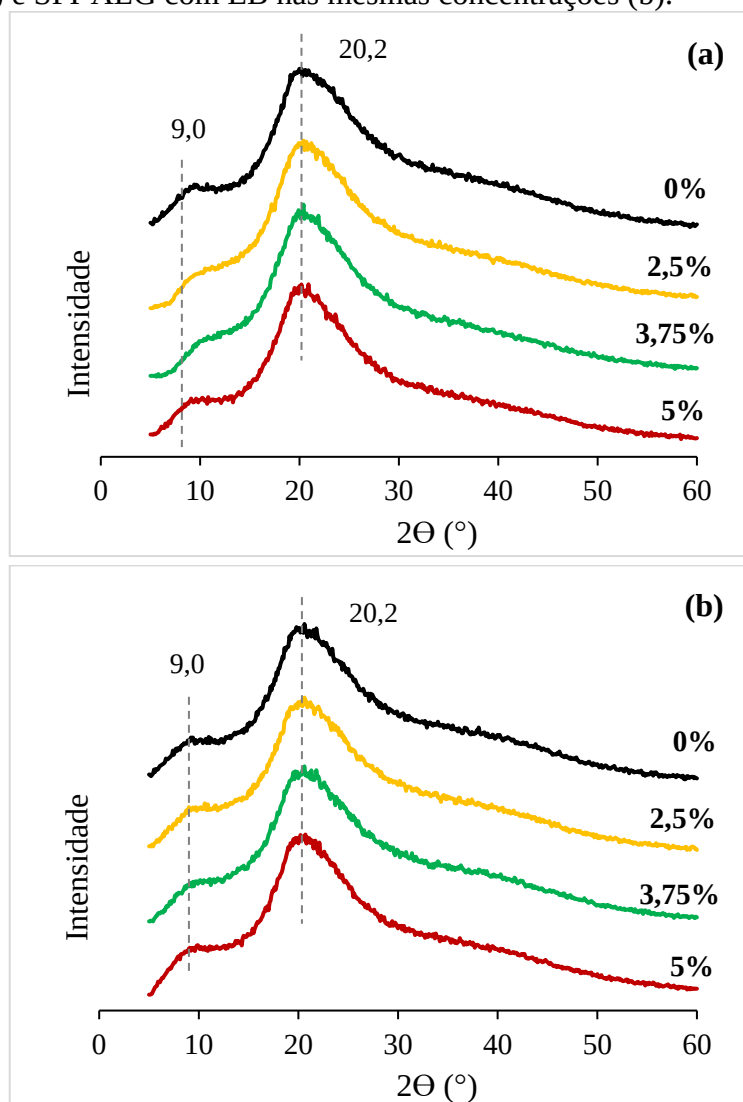
Filmes à base de SPI (Figura 4.6a) apresentaram um pico em torno de $2\theta = 20,2$, atribuído à estrutura de folha- β da SPI (Figura 4.5a), e outro mais discreto em $2\theta \approx 9$, que se mostrou mais intenso para as formulações com 5% EB. Em relação às diferentes concentrações de EB verificou-se que o ICR foi significativamente menor na formulação 2,5% EB em relação às restantes (Tabela 4.1). Pequena quantidade de extrato reduziu a cristalinidade relativa nos filmes de SPI, porém, maiores quantidades de EB não levaram a estruturas mais amorfas, pois apresentaram médias de cristalinidade estatisticamente iguais ao filme de SPI puro (Tabela 4.1).

Filmes à base de SPI-ALG (Figura 4.6b) apresentaram picos nas mesmas posições que os de SPI, entretanto, com menores intensidades, indicando que a adição do ALG reduziu a

cristalinidade dos filmes. Nos filmes sem extrato essa redução não foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 4.1). Em relação à adição de EB nos filmes de SPI-ALG, observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do índice de cristalinidade relativo (ICR), no entanto, não houve influência da quantidade de EB adicionado (Tabela 4.1). Portanto, apesar da adição do polissacarídeo não ter alterado a estrutura semicristalina do filme de SPI, a combinação ALG-EB fez com que o filme apresentasse menor ICR.

Apesar das alterações verificadas no ICR, a adição do EB, tanto nos filmes de SPI quanto SPI-ALG, não acarretou o aparecimento de novos picos, o que sugere uma boa compatibilidade entre os polímeros e o extrato vegetal, assim como verificado com a incorporação da erva *Phellodendron* em filmes de SPI (LIANG; WANG, 2018) e da casca de romã em filmes de proteína de feijão (MOGHADAM et al., 2020).

Figura 4.6 – Espectro de raio X dos filmes elaborados com SPI e EB em diferentes concentrações (a) e SPI-ALG com EB nas mesmas concentrações (b).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4.1 – Cristalinidade relativa das matérias-primas e dos filmes biodegradáveis.

Formulação	Cristalinidade relativa (%)
SPI em pó	33,62 ± 0,27
ALG em pó	7,63 ± 0,08
SPI-0% EB	33,71 ± 0,81 ^{a,A}
SPI-2,5% EB	31,41 ± 0,51 ^{b,A}
SPI-3,75% EB	33,17 ± 0,43 ^{a,A}
SPI-5% EB	34,19 ± 0,49 ^{a,A}
SPI-ALG-0% EB	32,78 ± 0,52 ^{a,A}
SPI-ALG-2,5% EB	29,95 ± 0,66 ^{b,B}
SPI-ALG-3,75% EB	29,87 ± 0,41 ^{b,B}
SPI-ALG-5% EB	29,58 ± 0,57 ^{b,B}

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a,b Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e mesma matriz polimérica indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de EB indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

4.3.4 Propriedades mecânicas

Resultados de espessura, tensão, deformação e módulo de Young dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com diferentes concentrações de extrato de beldroega (2,5; 3,75 e 5%) estão apresentados na Tabela 4.2.

Em relação à espessura, a análise estatística foi realizada entre todos os tratamentos, e observou-se que não houve alteração significativa ($p < 0,05$) com adição de ALG e EB. Tal fato era esperado, uma vez que foram realizados testes preliminares para determinar a quantidade de solução que deveria ser despejada na bandeja em função da formulação (Item 4.2.3).

Nos filmes simples de SPI observou-se que a menor concentração de EB (2,5%) reduziu a tensão e a deformação do filme de SPI, enquanto maiores concentrações (3,75 e 5% EB) apresentaram médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$) aos filmes sem adição do extrato. Quanto ao módulo de Young as médias variaram de 19,29 MPa (0% extrato) a 23,45 MPa (5% extrato), não sendo observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre as formulações, independentemente da quantidade de extrato adicionado ao filme de SPI. Esses resultados podem estar relacionados as fracas interações por meio de interações de hidrogênio entre SPI e EB, verificadas pelo FTIR.

A adição do polissacarídeo aos filmes de SPI e SPI+EB aumentou significativamente a tensão e módulo de Young e reduziu a elongação na ruptura dos filmes, tanto para o filme sem

extrato (0% EB) quanto para todas as concentrações de extrato analisadas. No caso da tensão, o aumento foi de 92% para os filmes sem extrato e em média 171% para os filmes com extrato, mostrando que a combinação do ALG e do EB foi vantajosa para resistência mecânica dos filmes de SPI. Provavelmente, o polissacarídeo e os compostos bioativos da beldroega, como flavonoides, interagiram com os grupos funcionais das moléculas SPI e contribuíram para uma maior resistência à tração em comparação com o filme simples de SPI. Han et al. (2018) e Maryam Adilah et al. (2018) adicionaram extrato de resíduo de alcaçuz e de caroço de manga, respectivamente, a filme de SPI, e atribuíram o aumento da tensão dos filmes com extrato à reticulação de grupos polifenólicos do extrato com a matriz da SPI. Vale ressaltar que o pH 11 utilizado para elaboração dos filmes nesse estudo pode ter contribuído para aumento da resistência dos filmes de SPI com ALG e EB, uma vez que em pHs elevados, distantes do ponto isoelétrico, as proteínas mudam sua forma globular para a forma de cadeia estendida, expondo grupos sulfidrila e hidrofóbicos, fato que pode facilitar interações intermoleculares e melhorar as propriedades mecânicas (MAURI; AÑÓN, 2008; OLIVEIRA, SILVA, MAURO, 2021).

Nos filmes compostos de SPI-ALG observou-se que a adição de EB aumentou significativamente ($p < 0,05$) a tensão, alongação na ruptura e módulo de Young desses filmes, mesmo com baixas concentrações do extrato vegetal (2,5%). Conforme maiores quantidades de extrato foram sendo adicionadas, maiores foram os valores de tensão e alongação obtidos. O aumento da tensão foi de 18,5% com acréscimo de 2,5% EB e atingiu 31,9% com 5% EB, enquanto a alongação na ruptura aumentou em 20,3 e 35,4%, com 2,5% e 5% EB, respectivamente. O módulo de Young, no entanto, não sofreu alteração em relação à quantidade de EB adicionado. Os resultados das propriedades mecânicas dos filmes compostos (SPI-ALG) podem estar relacionados à sua microestrutura. A presença do polissacarídeo na estrutura parece criar relevos na superfície do filme, com zonas mais elevadas que outras (Figura 4.4e a 4.4h), o que pode indicar uma separação de fases, em que cada fase fica enriquecida com um dos biopolímeros, fortalecendo a rede proteica e favorecendo a resistência do filme (Tabela 4.2). Portanto, a adição de EB parece ter contribuído ainda mais para fortalecimento da estrutura possivelmente pela formação de uma rede estável através da reticulação de grupos da matriz SPI-ALG com grupos polifenólicos do extrato, contribuiu para formação de filmes com elevada resistência mecânica (HAN et al., 2018; MARYAM ADILAH et al., 2018).

No caso dos filmes simples de SPI, notou-se que as formulações que apresentaram maior resistência (0; 3,75 e 5% EB, Tabela 4.2) foram as que apresentaram os maiores valores de cristalinidade relativa (Tabela 4.1). Essa relação também foi verificada por Soni et al. (2021), que analisaram filmes de nano fibra de celulose com adição de diferentes amidos e atribuíram

as maiores resistências ao aumento da cristalinidade. No entanto, essa relação não foi verificada no caso dos filmes com adição de ALG, no qual o mais cristalino (0% EB) apresentou menor resistência à ruptura. Além disso, o ICR dos filmes compostos (SPI-ALG) com EB não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), enquanto a resistência dos filmes com concentrações acima de 3,75% foi significativamente maior ($p < 0,5$), comparada à dos filmes com menores concentrações de extrato.

Tabela 4.2 – Espessura e propriedades mecânicas (tensão, deformação na ruptura e módulo de Young) dos filmes sem e com adição de diferentes concentrações de extrato de beldroega.

Formulação	Espessura (mm)	Tensão (MPa)	Deformação (%)	Módulo de Young (MPa)
SPI-0% EB	0,19 ± 0,04 ^a	2,75 ± 0,30 ^{a,B}	219,50 ± 27,94 ^{a,A}	19,29 ± 5,31 ^{a,B}
SPI-2,5% EB	0,20 ± 0,04 ^a	2,25 ± 0,38 ^{b,B}	179,97 ± 35,51 ^{b,A}	20,17 ± 3,49 ^{a,B}
SPI-3,75% EB	0,18 ± 0,03 ^a	2,47 ± 0,24 ^{ab,B}	222,73 ± 9,28 ^{a,A}	19,60 ± 2,49 ^{a,B}
SPI-5% EB	0,20 ± 0,05 ^a	2,67 ± 0,16 ^{a,B}	212,05 ± 34,83 ^{ab,A}	23,45 ± 2,86 ^{a,B}
SPI-ALG-0% EB	0,23 ± 0,02 ^a	5,28 ± 0,32 ^{c,A}	44,52 ± 3,24 ^{c,B}	75,53 ± 14,67 ^{b,A}
SPI-ALG-2,5% EB	0,21 ± 0,02 ^a	6,26 ± 0,56 ^{b,A}	53,56 ± 6,18 ^{b,B}	92,86 ± 8,62 ^{a,A}
SPI-ALG-3,75% EB	0,23 ± 0,03 ^a	6,81 ± 0,60 ^{a,A}	56,17 ± 3,93 ^{ab,B}	103,08 ± 17,64 ^{a,A}
SPI-ALG-5% EB	0,22 ± 0,02 ^a	6,96 ± 0,20 ^{a,A}	60,29 ± 8,09 ^{a,B}	98,12 ± 13,87 ^{a,A}

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a,b, c Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e mesma matriz polimérica indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de EB indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

4.3.5 Aparência visual e propriedades óticas

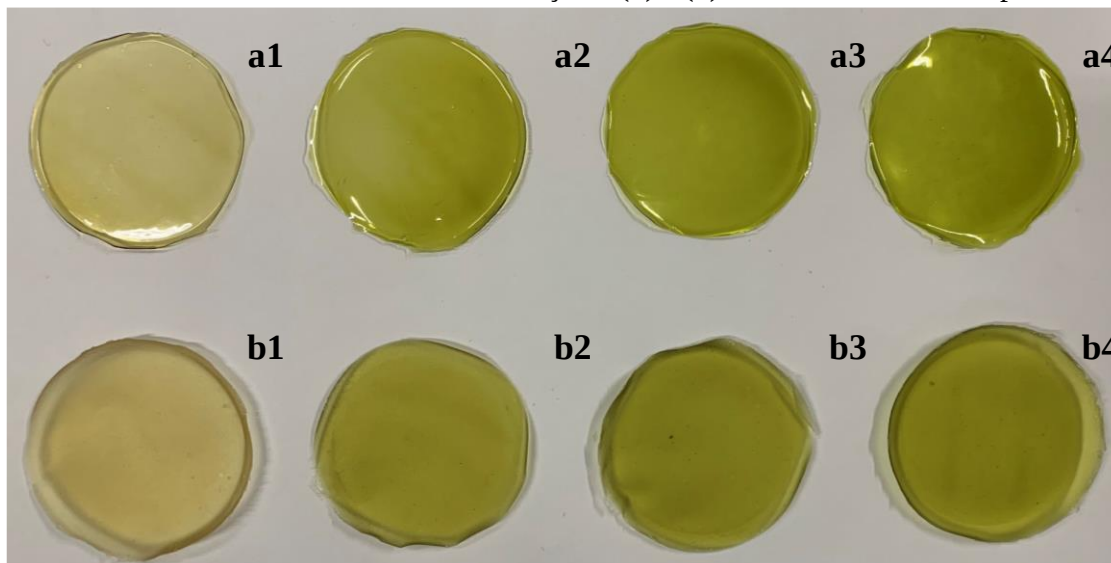
Aparência e propriedades óticas dos filmes são de primordial importância pois influenciam diretamente a aceitação do produto pelo consumidor quando utilizados como embalagem de alimentos, além da opacidade estar relacionada à barreira à luz, que induz reações de oxidação. Na Figura 4.7 observa-se a aparência macroscópica dos filmes de SPI e SPI-ALG, sem e com adição de EB em diferentes concentrações. Nota-se que filmes simples de SPI (Figura 4.7a) são mais brilhosos e transparentes comparados aos que contêm ALG (Figura 4.7b). Pela Tabela 4.3 é possível comprovar tal fato, verificando que a opacidade do filme composto (SPI-ALG) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a do filme simples (SPI), aumentando aproximadamente três vezes com a adição do polissacarídeo. Provavelmente isso

ocorreu devido ao aumento da rugosidade observada na estrutura superficial dos filmes SPI com adição de ALG (Figura 4.4e2), que aumentou a dispersão da luz e diminuiu a transparência dos filmes (ACOSTA et al., 2015; AMADO; SILVA; MAURO, 2020). Houve aumento na opacidade, também significativo, com a adição de ALG aos filmes de SPI-EB. Em relação à adição de EB aos filmes simples e compostos, observou-se que o extrato proporcionou comportamento diferente dependendo de cada matriz polimérica, uma vez que ao ser adicionado nos filmes simples de SPI, ocasionou redução da opacidade, enquanto nos filmes SPI-ALG, levou a um aumento da opacidade. Nos filmes compostos (SPI-ALG) conforme a concentração de extrato foi sendo incrementada na solução filmogênica, os valores de opacidade cresceram mais que proporcionalmente, chegando a um aumento de 33% na formulação com 5% EB, em relação ao filme sem extrato.

O parâmetro L^* foi reduzido significativamente ($p < 0,05$) com a adição de EB, tanto nos filmes de SPI quanto de SPI-ALG, indicando que o extrato acarretou uma redução da claridade dos filmes. Pelos dados obtidos do extrato (Tabela 4.3) nota-se que este apresenta valor de L^* , a^* e b^* próximos a zero, e, portanto, tendendo ao preto, o que corrobora o escurecimento dos filmes observado após adição do EB. Tendências semelhantes na variação de L^* foram observadas com adição de outros extratos com propriedades antioxidantes em filmes de SPI, como extrato de castanha (WANG et al., 2016), extrato de caroço de manga (MARYAM ADILAH et al., 2018) e extrato de pinhão (SOUZA et al., 2020).

Em relação ao parâmetro a^* , o extrato reduziu significativamente ($p < 0,05$) seu valor, tornando-o mais negativo, portanto, tendendo ao verde. O valor de b^* do filme de SPI foi 33,73, responsável pela coloração amarela característica dos filmes à base de proteína de soja (MAURI; AÑÓN, 2008; SOUZA et al., 2020). O valor de b^* do filme composto (SPI-ALG) apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao filme simples (SPI), e ambos apresentaram aumento significativo com acréscimo gradual de EB, apenas não diferindo entre as concentrações de 3,75 e 5% EB nas soluções filmogênicas dos filmes compostos. Comportamento semelhante, de redução do a^* e aumento de b^* , foi reportado anteriormente após adição de extrato vegetal de *Cedrus Deodara* em filmes de proteína de soja com nanocristais de celulose (YU et al., 2018).

Figura 4.7 – Fotos dos filmes elaborados com SPI (5%) sem (a) e com adição de ALG (1%) (b), acrescidos de EB em diferentes concentrações: (1) a (4): 0; 2,5; 3,75 e 5%, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4.3 – Parâmetros de cor e opacidade dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição de diferentes concentrações de extrato de beldroega.

Formulação	Opacidade	L*	a*	b*
Extrato beldroega	-	1,69 ± 0,13	2,06 ± 0,13	2,19 ± 0,13
SPI-0% EB	4,98 ± 0,21 ^{a,B}	83,28 ± 0,93 ^{a,A}	-3,80 ± 0,43 ^{a,B}	33,73 ± 3,04 ^{d,B}
SPI-2,5% EB	4,04 ± 0,48 ^{bc,B}	77,41 ± 1,61 ^{b,A}	-5,86 ± 0,48 ^{c,B}	54,48 ± 4,62 ^{c,A}
SPI-3,75% EB	3,91 ± 0,45 ^{c,B}	75,69 ± 3,21 ^{b,A}	-7,65 ± 0,70 ^{d,B}	60,73 ± 6,49 ^{b,A}
SPI-5% EB	4,48 ± 0,48 ^{b,B}	66,98 ± 2,59 ^{c,A}	-5,12 ± 0,33 ^{b,B}	72,87 ± 2,13 ^{a,A}
SPI-ALG-0% EB	14,44 ± 0,25 ^{c,A}	79,10 ± 0,77 ^{a,B}	-1,04 ± 0,32 ^{a,A}	37,95 ± 0,88 ^{c,A}
SPI-ALG-2,5% EB	16,36 ± 0,18 ^{b,A}	69,99 ± 0,42 ^{b,B}	-3,28 ± 0,29 ^{b,A}	53,93 ± 0,57 ^{b,A}
SPI-ALG-3,75% EB	16,77 ± 0,49 ^{b,A}	68,39 ± 0,62 ^{c,B}	-4,80 ± 0,36 ^{d,A}	55,80 ± 0,30 ^{a,B}
SPI-ALG-5% EB	19,14 ± 0,93 ^{a,A}	62,79 ± 1,88 ^{d,B}	-3,94 ± 0,41 ^{c,A}	55,69 ± 0,80 ^{a,B}

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a, b, c, d Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e mesma matriz polimérica indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A, B Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de EB indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

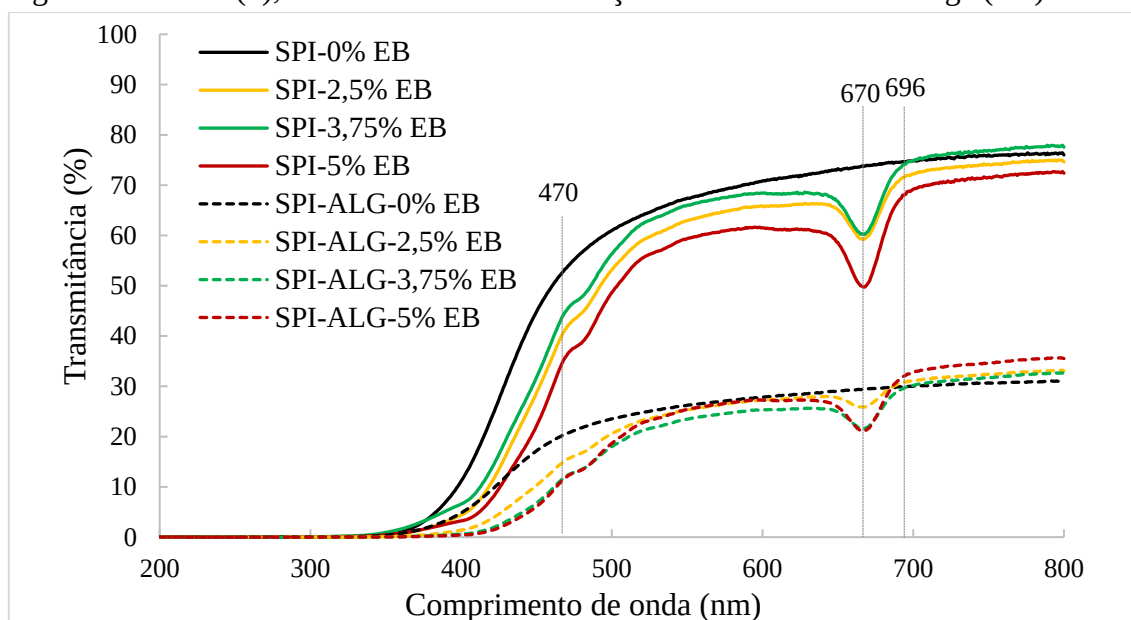
A Figura 4.8 apresenta a transmitância a luz dos filmes SPI (5%) e SPI (5%)-ALG (1%) sem e com EB em diferentes concentrações, na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Observou-se que não houve transmissão a luz na faixa do ultravioleta (200 -350 nm), para todos os filmes analisados, independentemente do nível de extrato. Provavelmente isso se deve aos compostos presentes no SPI, como tirosina, fenilalanina e triptofano, que são

cromóforos sensíveis que absorvem luz abaixo de 300 nm (LI et al., 2004; WANG et al., 2016). Na faixa do visível (350-800 nm) a transmitância variou entre as diferentes formulações. Comparando os filmes de SPI e SPI-ALG nota-se que filmes sem adição do polissacarídeo foram os que mais transmitiram luz. Em relação à adição de EB, observa-se que, até o comprimento de onda de aproximadamente 696 nm, o extrato reduz a transmitância dos filmes, tanto para os simples quanto para os compostos, dados que corroboram com as medidas de opacidade (Tabela 4.3). Acima de 696 nm, no entanto, o filme de SPI transmite próximo ao filme 3,75%EB e o filme SPI-ALG passa a transmitir menos que os filmes compostos com adição de EB.

Verificou-se que os filmes com extrato apresentaram dois picos, em aproximadamente 470 nm e 670 nm. Os picos de menor intensidade, em 470 nm, podem estar relacionados à presença de carotenoides. Picos mais evidentes, em aproximadamente 670 nm, provavelmente se devem à presença de clorofila, principal pigmento das plantas verdes, que apresenta banda de absorção óptica variando de 650 a 700 nm (DOMÍNGUEZ-PACHECO; HERNÁNDEZ-AGUILAR; CRUZ-OREA, 2017; LIU et al., 2000; VALENCIA-HERNANDEZ et al., 2020).

Figura 4.8 – Transmitância dos filmes elaborados com SPI (5%) sem (a) e com adição de alginato de sódio (b), com diferentes concentrações de extrato de beldroega (EB).



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.6 Teor de água, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água

A umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de SPI e SPI-ALG, ambos sem e com adição de diferentes concentrações de extrato de beldroega, estão apresentados na Tabela 4.4.

Os resultados de teor de água variaram de 14,50 a 15,15 (g/100g amostra) quando consideradas todas as formulações de filme biodegradável, não se observando diferença significativa ($p < 0,05$) sobre o teor de água dos filmes de SPI com adição de ALG e de EB.

A solubilidade em água, que corresponde à capacidade do filme de se dissolver na água em condições previamente estabelecidas (neste caso após 24 h à temperatura de 25°C e agitação constante) é uma propriedade importante dos filmes biodegradáveis, uma vez que uma estabilidade razoável é esperada para que sejam possíveis aplicações relacionadas a embalagem de alimentos (ERDEM et al., 2022; SU et al., 2010). De acordo com os resultados, a adição de ALG causou um aumento significativo ($p < 0,05$) na solubilidade dos filmes, independentemente da quantidade de EB. Este resultado pode ser atribuído à natureza hidrofílica do ALG, levando a um aumento da afinidade pela água na matriz dos filmes. A adição de EB, no entanto, não alterou a solubilidade em água dos filmes simples (SPI), que foi em média 41,5%, e mostrou tendência de aumento da solubilidade dos filmes compostos (SPI-ALG). Filmes SPI-ALG-EB (5%) apresentaram solubilidade significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao filme sem EB e com 3,75%EB.

Em relação à permeabilidade ao vapor da água observou-se que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) com adição de EB, tantos nos filmes de SPI quanto de SPI-ALG, nos dois gradientes de umidade relativa analisados (Tabela 4.4). A única diferença estatística observada foi em relação à adição de ALG aos filmes SPI-5%EB, que aumentou significativamente na maior UR média analisada. Quanto à influência da UR que circunda o filme, observou-se tendência de aumento da PVA quando expostos a uma UR média maior (90-64,5%), o que provavelmente está relacionado à saturação dos sítios de ligação com água com aumento da UR média (AMADO; SILVA, MAURO, 2020; BRANDELERO; YAMASHITA; GROSSMANN, 2010).

Tabela 4.4 – Umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição de extrato de beldroega.

Formulação	Teor de água (g/100g amostra)	Solubilidade em água (%)	PVA × 10 ¹⁰ (g/m·s·Pa)	
			ΔUR (%) = 100-2	ΔUR (%) = 90-64,5
SPI-0% EB	15,12 ± 0,66 ^{a,A}	41,76 ± 1,86 ^{a,B}	5,40 ± 1,67 ^{a,A}	8,50 ± 1,89 ^{a,A}
SPI-2,5% EB	15,13 ± 0,42 ^{a,A}	41,73 ± 1,42 ^{a,B}	5,24 ± 0,70 ^{a,A}	10,98 ± 3,64 ^{a,A}
SPI-3,75% EB	15,05 ± 0,32 ^{a,A}	41,25 ± 0,51 ^{a,B}	5,55 ± 1,81 ^{a,A}	7,58 ± 0,78 ^{a,A}
SPI-5% EB	14,50 ± 0,71 ^{a,A}	41,52 ± 0,52 ^{a,B}	6,85 ± 2,15 ^{a,A}	7,11 ± 2,10 ^{a,B}
SPI-ALG-0% EB	15,15 ± 0,71 ^{a,A}	49,95 ± 0,80 ^{b,A}	6,48 ± 0,46 ^{a,A}	9,47 ± 0,39 ^{a,A}
SPI-ALG-2,5% EB	14,91 ± 0,74 ^{a,A}	50,78 ± 0,49 ^{ab,A}	5,95 ± 0,73 ^{a,A}	9,42 ± 0,80 ^{a,A}
SPI-ALG-3,75% EB	14,79 ± 0,47 ^{a,A}	50,16 ± 0,25 ^{b,A}	6,19 ± 1,42 ^{a,A}	9,90 ± 1,75 ^{a,A}
SPI-ALG-5% EB	15,14 ± 0,63 ^{a,A}	51,54 ± 0,86 ^{a,A}	5,90 ± 0,75 ^{a,A}	11,53 ± 1,48 ^{a,A}

*Resultados expressos em (média ± desvio padrão)

**a,b Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e mesma matriz polimérica indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de EB indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

4.3.7 Atividade antioxidante

A Tabela 4.5 apresenta atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH, do extrato de beldroega e dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição do extrato, que foi acrescentado nas porcentagens de 2,5; 3,75 e 5%. Vale ressaltar que nos filmes com menor concentração de extrato foi adicionado álcool etílico 80% (solvente utilizado na extração da planta), atingindo assim quantidades equivalentes de solvente em todas as formulações.

Notou-se que filmes de SPI e SPI-ALG, sem adição de extrato, apresentaram atividade antioxidante não desprezível, a qual pode ser atribuída a alguns aminoácidos da SPI (como fenilalanina, cisteína, histidina, tirosina e triptofano), considerados potentes captadores de radicais livres (KANG et al., 2013; WANG et al., 2016). Com a adição do ALG houve redução significativa ($p < 0,05$) da atividade antioxidante, que pode estar relacionada a alterações na estrutura da rede polimérica.

A capacidade de captura do radical DPPH aumentou significativamente ($p < 0,05$) com a adição do EB, tanto para os filmes de SPI quanto de SPI-ALG, no entanto, em magnitudes diferentes. Nos filmes simples a atividade antioxidante aumentou em média 85%, e não se verificou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações de EB. Para os

filmes SPI-ALG o aumento foi de 62% com 2,5 e 3,75%EB e atingiu 75% com 5%EB, cujo aumento foi significativo em relação às menores concentrações. Esses resultados podem estar associados às fracas interações entre SPI e EB, como verificado pela análise de FTIR e de propriedades mecânicas, que podem ter permitido que os compostos antioxidantes fossem facilmente liberados dos filmes SPI durante a extração (WANG et al., 2016). Como os filmes SPI-ALG-EB apresentam interações mais fortes, verificadas principalmente pela maior tensão (Tabela 4.2), é possível que a liberação dos compostos antioxidantes tenha sido dificultada nos filmes compostos com EB, os quais apresentaram menores aumentos na capacidade antioxidante com a adição do extrato vegetal. Han et al. (2018) em sua revisão pontuam que a atividade antioxidante nem sempre aumenta linearmente com acréscimo de antioxidante, podendo até ser reduzida. Os autores atribuem o fato a um possível excesso de compostos antioxidantes ou à interação entre os antioxidantes e a matriz polimérica.

Tabela 4.5 – Atividade antioxidante pelo método DPPH do extrato de beldroega e dos filmes de SPI e SPI-ALG sem e com adição de diferentes concentrações do extrato.

Formulação	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{g}$)
Extrato beldroega	1246,21 $\pm$ 170,38
SPI-0% EB	72,91 $\pm$ 1,60 ^{b,A}
SPI-2,5% EB	136,22 $\pm$ 6,64 ^{a,A}
SPI-3,75% EB	135,76 $\pm$ 4,66 ^{a,A}
SPI-5% EB	131,76 $\pm$ 6,35 ^{a,A}
SPI-ALG-0% EB	56,69 $\pm$ 4,32 ^{c,B}
SPI-ALG-2,5% EB	92,05 $\pm$ 7,20 ^{b,B}
SPI-ALG-3,75% EB	92,30 $\pm$ 4,49 ^{b,B}
SPI-ALG-5% EB	99,07 $\pm$ 2,98 ^{a,B}

*Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão)

**a,b, c Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e mesma matriz polimérica indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

***A,B Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e mesma concentração de EB indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

4.4 Conclusões

O acréscimo de ALG 1% em filmes de SPI 5% não alterou a cristalinidade relativa, umidade e permeabilidade ao vapor de água e reduziu a atividade antioxidante dos filmes SPI,

no entanto, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a tensão, a elongação na ruptura, o módulo de Young e a barreira à luz.

A adição de extrato de beldroega (EB) em filmes à base de SPI e SPI-ALG não alterou a estrutura dos filmes (FTIR), no entanto, reduziu a cristalinidade relativa dos filmes de SPI com acréscimo de pequena quantidade (2,5%) e dos filmes de SPI-ALG com adição de todas as concentrações estudadas (2,5 a 5%). Além disso, a incorporação de EB aos filmes biodegradáveis simples e compostos aumentou a opacidade e a atividade antioxidante deles, e nos filmes compostos também aumentou a resistência à tensão. Portanto, EB pode ser utilizado em filmes biodegradáveis e comestíveis com intuito de, principalmente, aumentar sua resistência mecânica e prolongar a vida útil de alimentos embalados devido à maior barreira a luz e à maior atividade antioxidante.

Deste modo, extratos naturais de plantas, como de *Portulaca oleracea* L., podem ser ingredientes promissores para formação de filmes simples de proteína e compostos de proteína-polissacarídeo, resultando em filmes com diferentes propriedades físico-químicas que podem ser destinados a diferentes aplicações.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, S.; JIMÉNEZ, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 135-143, 2015.

AMADO, L. R.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Effects of interactions between soy protein isolate and pectin on properties of soy protein-based films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 21, p. 48732, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.48732>.

A.O.A.C. In Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists; W. Horwitz, Ed.; A.O.A.C: Arlington, **1995**; Chapter 33.

ASTM INTERNATIONAL. ASTM D882-12, **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**, West Conshohocken, PA, 2012.

ASTM INTERNATIONAL. ASTM E96-95: **Standard test methods of water vapor transmission of materials**. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1995.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1285–1289, 2007.

BLÁZQUEZ, M. A.; CARBÓ, E. Control of *Portulaca oleracea* by boldo and lemon essential oils indifferent soils. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 515–521, 2015.

BRANDELERO, R., P. H.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. The effect of surfactant Tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1102–1109, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAO, N.; FU, Y.; HE, J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1153–1162, 2007.

CHANG-BRAVO, L.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; MARTINO, M. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive & Functional Polymers**, v. 85, p. 11–19, 2014.

CHEN, J.; CHEN, X.; ZHU, Q.; CHEN, F.; ZHAO, X.; AO, Q. Determination of the domain structure of the 7S and 11S globulins from soy proteins by XRD and FTIR. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1687–1691, 2013.

CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 193-204, 2014.

CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Properties and antioxidant activity of soy protein concentrate films incorporated with red grape extract processed by casting and compression molding. **LWT - Food Science Technology**, v. 74, p. 353-362, 2016.

CRIZEL, T. M.; RIOS, A. O.; ALVES, V. D.; BANDARRA, N.; MOLDÃO-MARTINS, M.; FLÔRES, S. H. Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 139-150, 2018.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.; GUILBERT, S. Functional Properties of Myofibrillar Protein-based Biopackaging as Affected by Film Thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, 1996.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. **Cereal Chemistry**, v. 75, 1998.

DOMÍNGUEZ-PACHECO, A.; HERNÁNDEZ-AGUILAR, C.; CRUZ-OREA, A. Photoacoustic Determination of Non-radiative Relaxation Time of Absorbing Centers in Maize Seeds. **International Journal of Thermophysics**, v. 38, p. 1-8, 2017.

EL-DESOUKY, T. A. Evaluation of effectiveness aqueous extract for some leaves of wild edible plants in Egypt as anti-fungal and anti-toxicogenic. **Heliyon**, v. 7, p. 06209, 2021.

ERDEM, B. G.; KAYA, S. Characterization and application of novel composite films based on soy protein isolate and sunflower oil produced using freeze drying method. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130709, 2022.

FAN, X.; LIU, S.; LI, H.; HE, J.; FENG, J.; ZHANG, X.; YAN, H. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipid oxidation and color of pork meat during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 147, p. 82–90, 2019.

FARKHONDEH, T.; SAMARGHANDIAN, S. The therapeutic effects of *Portulaca oleracea* L. in hepatogastric disorders. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 42, p. 127–132, 2019.

FRIESEN, K.; CHANG, C.; NICKERSON, M. Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: Mechanical, barrier and cross-linking properties. **Food Chemistry**, v. 172, p. 18–23, 2015.

GARRIDO, T.; ETXABIDE, A.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Characterization of agar/soy protein biocomposite films: Effect of agar on the extruded pellets and compression moulded films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 408–416, 2016.

GARTI, N.; SLAVIN, Y.; ASERIN, A. Surface and emulsification properties of a new gum extracted from *Portulaca oleracea* L. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 145–155, 1999.

HAN, J.; RUIZ-GARCIA, L.; QIAN, J.; YANG, X. Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 860–877, 2018.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Preparation and characterization of antioxidant soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 13–21, 2018.

HAYAKAWA, K.; TANAKA, K.; NAKAMURA, T.; ENDO, S.; HOSHINO, T. Quality Characteristics of Waxy Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.): Properties of Starch Gelatinization and Retrogradation. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 576–580, 1997.

HUO, P.; NI, S.; HOU, P.; XUN, Z.; LIU, Y.; GU, J. A Crosslinked Soybean Protein Isolate Gel Polymer Electrolyte Based on Neutral Aqueous Electrolyte for a High-Energy-Density Supercapacitor. **Polymers**, v. 11, p. 863, 2019.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of sodium caseinate on properties and ageing behaviour of corn starch based films. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 265–271, 2012.

JIN, S.; LI, K.; XIA, C.; LI, J. Sodium alginate-assisted route to antimicrobial biopolymer film combined with aminoclay for enhanced mechanical behaviors. **Industrial Crops & Products**, v. 135, p. 271–282, 2019.

KANG, H.; KIM, S.; YOU, Y.; LACROIX, M.; HAN, J. Inhibitory effect of soy protein coating formulations on walnut (*Juglans regia* L.) kernels against lipid oxidation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 393–396, 2013.

KANG, H.; WANG, Z.; ZHANG, W.; LI, J.; ZHANG, S. Physico-chemical properties improvement of soy protein isolate films through caffeic acid incorporation and tri-functional aziridine hybridization. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 923–932, 2016.

LAROSA, C.; SALERNO, M.; LIMA, J. S.; MERI, R. M.; SILVA, M. F.; CARVALHO, L. B.; CONVERTI, A. Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 900–906, 2018.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106–126, 2012.

LIANG, S.; WANG, L. A Natural Antibacterial-Antioxidant Film from Soy Protein Isolate Incorporated with Cortex *Phellodendron* Extract. **Polymers**, v. 10, p. 71, 2018.

LI, H.; LIU, B. L.; GAO, L. Z.; CHEN, H. L. Studies on bullfrog skin collagen. **Food Chemistry**, v. 84, p. 65–69, 2004.

LI, T.; XIA, N.; XU, L.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; CHI, Y.; ZHANG, Y.; LI, L.; LI, H. Preparation, characterization and application of SPI-based blend film with antioxidant activity. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, 100614, 2021.

LIU, L.; HOWE, P.; ZHOU, Y.; XU, Z.; HOCART, C.; ZHANG, R. Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 207–213, 2000.

LI, Y.; CHEN, H.; DONG, Y.; LI, K.; LI, L.; LI, J. Carbon nanoparticles/soy protein isolate bio-films with excelente mechanical and water barrier properties. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 133–140, 2016.

MAIZURA, M.; FAZILAH, A.; NORZIAH, M. H.; KARIM, A. A. Antibacterial Activity and Mechanical Properties of Partially Hydrolyzed Sago Starch–Alginate Edible Film Containing Lemongrass Oil. **Journal of Food Science**, v. 72, p.324–330, 2007.

MARYAM ADILAH, Z. A.; JAMILAH, B.; NUR HANANI, Z. A. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 207–218, 2018.

MAURI, A. N.; AÑÓN, M. C. Mechanical and Physical Properties of Soy Protein Films with pH-Modified Microstructures. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 2, p. 119–125, 2008.

MELILLI, M. G.; PAGLIARO, A.; SCANDURRA, S.; GENTILE, C.; STEFANO, V. D. Omega-3 rich foods: Durum wheat spaghetti fortified with *Portulaca oleracea*. **Food Bioscience**, v.37, 100730, 2020.

MOGHADAM, M.; SALAMI, M.; MOHAMMADIAN, M.; KHODADADI, M.; EMAM-DJOMEH, Z. Development of antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with pomegranate peel. **Food Hydrocolloids**, v. 104, 105735, 2020.

OLIVEIRA, M. M. G.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Evaluation of Interactions Between Carboxymethylcellulose and Soy Protein Isolate and their Effects on the Preparation and Characterization of Composite Edible Films. **Food Biophysics**, v. 16, p. 214–228, 2021.

OU, S.; KWOK, K. C.; KANG, Y. Changes in in vitro digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 301–305, 2004.

PETROPOULOS, S. A.; KARKANIS, A.; FERNANDES, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; NTATSI, G.; PETROTOS, K.; LYKAS, C.; KHAH, E. Chemical Composition and Yield of Six Genotypes of Common Purslane (*Portulaca oleracea* L.): An Alternative Source of Omega-3 Fatty Acids. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 420–426, 2015.

RANGARAJ, V. M.; RAMBABU, K.; BANAT, F.; MITTAL, V. Natural antioxidants-based edible active food packaging: An overview of current advancements. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101251, 2021.

RANI, P.; YU, X.; LIU, H.; LI, K.; HE, Y.; TIAN, H.; KUMAR, R. Material, antibacterial and anticancer properties of natural polyphenols incorporated soy protein isolate: A review. **European Polymer Journal**, v. 152, p. 110494, 2021.

RHIM, J-W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v.37, p. 323–330, 2004.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 438-447, 2009.

SAMPRASIT, W.; CHAMSAI, B.; SETTHARAKSA, S.; OPANASOPIT, P. Synergistic antibacterial activity of alpha mangostin and resveratrol loaded polymer-based films against bacteria infected wound. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, p. 101629, 2020.

SANCHES-SILVA, A.; COSTA, D.; ALBUQUERQUE, T. G.; BUONOCORE, G. G.; RAMOS, F.; CASTILHO, M. C.; MACHADO, A. V.; COSTA, H. S. Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, p. 374–395, 2014.

SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; CHO, S.; GHODAKE, G.; BHARAGAVA, R. N.; PARK, Y.; MULLA, S. I.; KIM, D.; KADAM, A.; NAIR, S.; SHIN, H. Investigation of photocatalytic degradation of reactive textile dyes by *Portulaca oleracea*-functionalized silver nanocomposites and exploration of their antibacterial and antidiabetic potentials. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 833, 2020.

SILVA, I. D. L.; MORAIS FILHO, L. E. P. T.; CAETANO, V. F.; ANDRADE, M. F.; HALLWASS, F.; BRITO, A. M. S. S.; VINHAS, G. M. Development of antioxidant active PVA films with plant extract of *Caesalpinia ferrea Martius*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 144, p. 111215, 2021.

SILVA, K. S.; FONSECA, T. M. R.; AMADO, L. R.; MAURO, M. A. Physicochemical and microstructural properties of whey protein isolate-based films with addition of pectin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 16, p. 122-128, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.005>.

SILVA, K. S. S.; MEDEIROS, K. A. S.; AMADO, L. R.; OLIVEIRA, M. M. G.; PICOLLOTO, A. M.; SAKAI, O. A. Interação entre goma alfarroba e proteína concentrada de soja na fabricação de filmes compostos biodegradáveis. In **Prática e pesquisa em ciência e tecnologia de alimentos 2**. Cap. 10, Ed. Atena, p. 99-110, 2020.

SIMOPOULOS, A. P.; NORMAN, H. A.; GILLASPY, J. E.; DUKE, J. A. Common purslane: a source of omega-3 fatty acids and antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 374-382, 1992.

SODEIFIAN, G.; ARDESTANI, N. S.; SAJADIAN, S. A.; MOGHADAMIAN, K. Properties of *Portulaca oleracea* seed oil via supercritical fluid extraction: Experimental and optimization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 135, p. 34-44, 2018.

SONI, R.; HSU, Y.; ASOH, T.; UYAMA, H. Synergistic effect of hemiacetal crosslinking and crystallinity on wet strength of cellulose nanofiber-reinforced starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106956, 2021.

SOUZA, K. C.; CORREA, L. G.; SILVA, T. B. V. MOREIRA, T. F. M.; OLIVEIRA, A.; SAKANAKA, L. S.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; VALDERRAMA, P.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Soy Protein Isolate Films Incorporated with Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) Extract for Potential Use as Edible Oil Active Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, p. 998-1008, 2020.

SU, J. F., HUANG, Z., YUAN, X. Y., WANG, X. Y., LI, M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 145-153, 2010.

TIAN, H.; GUO, G.; FU, X.; YAO, Y.; YUAN, L.; XIANG, A. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 475-490, 2018.

VALENCIA-HERNANDEZ, J. E.; HERNANDEZ-AGUILAR, C.; DOMINGUEZ-PACHECO, A.; CRUZ-OREA, A. Optical absorption spectra of germinated seedlings from seeds exposed to vehicle polluting gases. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 609, 2020.

WANG, H.; HU, D.; MA, Q.; WANG, L. Physical and antioxidant properties of flexible soy protein isolate films by incorporating chestnut (*Castanea mollissima*) bur extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 33-39, 2016.

YU, Z.; SUN, L.; WANG, W.; ZENG, W.; MUSTAPHA, A.; LIN, M. Soy protein-based films incorporated with cellulose nanocrystals and pine needle extract for active packaging. **Industrial Crops & Products**, v. 112, p. 412-419, 2018.

ZOU, Y.; WU, C.; MA, C.; HE, S.; BRENNAN, C. S. YUAN, Y. Interactions of grape seed procyanidins with soy protein isolate: Contributing antioxidant and stability properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, p. 108465, 2019.

Capítulo 5

Filmes biodegradáveis e ativos aplicados como embalagens de chips de manga (Mangifera indica L.)

5 FILMES BIODEGRADÁVEIS E ATIVOS APLICADOS COMO EMBALAGENS DE *CHIPS* DE MANGA (*MANGIFERA INDICA* L.)

RESUMO

A adição de polissacarídeos e de extratos de plantas com atividade antioxidante podem melhorar as características de filmes elaborados apenas por proteína. No presente estudo foi utilizado alginato de sódio (ALG) e extrato de beldroega (*Portulaca oleracea* L.) (EB) para elaboração de filmes biodegradáveis à base de proteína isolada de soja (SPI), visando aumentar a proteção contra as reações de oxidação de *chips* de manga durante armazenamento. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho desses filmes na forma de embalagem tipo sachê para *chips* de manga. Foram investigadas embalagens biodegradáveis de SPI, de SPI com alginato de sódio (SPI-ALG) e de ambas com adição de EB (SPI-EB e SPI-ALG-EB), as quais foram comparadas entre si e com uma embalagem de polietileno de alta densidade (PEAD), avaliando-se a permeabilidade (ao oxigênio e ao vapor de água) e a opacidade dos filmes, bem como a eficácia das embalagens sobre a qualidade física e química de *chips* de manga ao longo do tempo. Alterações de qualidade de *chips* de manga envasados a vácuo, nas diferentes embalagens, foram determinadas durante armazenamento a 25 °C por 100 dias, com base em parâmetros de cor, conteúdo de β -caroteno e atividade antioxidante (realizada pelos métodos ABTS e DPPH). Os resultados de diferença total de cor foram descritos pelo modelo de cinética de reação de ordem zero e mostraram que a embalagem convencional (PEAD) preservou de forma mais efetiva a cor dos *chips* de manga, enquanto a embalagem elaborada apenas com SPI apresentou maior taxa de perda da cor. As variações de conteúdo de β -caroteno e atividade antioxidante pelo método DPPH foram descritas pelo modelo de cinética de reação de segunda ordem. A cinética de β -caroteno demonstrou que a embalagem de PEAD apresentou maior taxa de oxidação desses compostos nos *chips* de manga, provavelmente devido à maior permeabilidade ao oxigênio do que as embalagens biodegradáveis, como foi constatado no presente trabalho. Pelo modelo de cinética do DPPH, no entanto, apesar da segunda maior constante de velocidade de reação corresponder às amostras armazenadas no PEAD, ela apresentou pouca diferença em relação às amostras em embalagens com alginato. As embalagens biodegradáveis causaram maior alteração dos parâmetros de cor dos *chips* de manga em relação ao PEAD, sem provocar alterações nutricionais relevantes, o que sugere algum tipo de interação entre o filme e as amostras. No geral, dentre os filmes biodegradáveis, o SPI-ALG parece ter sido o que mais contribuiu para manutenção da qualidade dos *chips* de

manga, apresentando menor taxa de alteração de cor entre os biodegradáveis e menor taxa de degradação de β -caroteno entre todos os filmes analisados, sendo, portanto, uma boa alternativa para preservação da qualidade de frutas secas armazenadas a vácuo e em temperatura ambiente.

5.1 Introdução

A embalagem de plástico é de extrema importância na preservação da qualidade e no transporte de alimentos (DEBEAUFORT; QUEZADA-GALLO; VOILLEY, 1998). No entanto, por não serem biodegradáveis e possuírem ineficiente processo de reciclagem, sua utilização tem um enorme impacto negativo ao meio ambiente. Assim, é crescente o interesse em desenvolver materiais biodegradáveis, sendo os filmes à base de polímeros naturais (como proteínas, polissacarídeos ou a combinação deles) alternativas promissoras aos filmes plásticos derivados do petróleo (CAZÓN et al., 2017; HAN; YU; WANG, 2018; WIHODO; MORARU, 2013). Além disso, esses filmes podem, opcionalmente, ser consumidos como alimento (RATTAYA et al., 2009). Adicionalmente às vantagens ao meio ambiente, essas embalagens podem fornecer uma melhor barreira ao oxigênio e à luz comparada ao polímero sintético, e podem, ainda, conter antioxidantes naturais, uma oportunidade para enriquecer os produtos embalados e aumentar sua vida útil (SAHRAEE et al., 2019; SHELDON; NORTON, 2020; RANGARAJ et al., 2021; SONI et al., 2021; VIDAL et al., 2022). Embalagem com adição de compostos antioxidante pode ser considerada um “sistema de embalagem ativa”, que corresponde a uma técnica relativamente recente que busca, através da interação de compostos da embalagem com o alimento, aumentar a vida útil do produto, mantendo a segurança e a qualidade, razão pela qual vem recebendo grande atenção em aplicações de armazenamento de alimentos (KOSHY et al., 2015; RANGARAJ et al., 2021).

Dentre os biopolímeros, a proteína de soja é um dos recursos de biomassa mais abundante do planeta, possuindo baixo preço e grande potencial de aplicação como material de embalagem de alimentos. A proteína isolada de soja (SPI), que é produzida a partir da soja desengordurada, é considerada um subproduto da indústria de óleo de soja, de extração simples e alto rendimento, além de ser rica em grupos funcionais (MARYAM ADILAH; JAMILAH; NUR HANANI, 2018; RANI et al., 2021). No entanto, não há uma fonte de proteína individual capaz de fornecer todas as propriedades desejadas do filme comestível, permanecendo uma necessidade de explorar novas misturas, como adição de polissacarídeos e/ou extratos vegetais, visando aprimorar as propriedades e melhorar o desempenho geral dos filmes biodegradáveis à base de proteína.

O alginato de sódio é um polissacarídeo linear e solúvel em água, isolado de algas marrons (*Phaeophyceae*). É constituído por monômeros de ácido β -D-manurônico e resíduos de α -L-ácido gulurônico ligados em diferentes proporções na cadeia. Além disso, é considerado um biopolímero de baixo custo, não tóxico, biodegradável e biocompatível, que apresenta propriedades promissoras para formação de filmes comestíveis (BAGHERI; RADI; AMIRI, 2019; PARREIDT; MÜLLER; SCHMID, 2018; RHIM, 2004).

Embalagens comestíveis ativas estão sendo desenvolvidas pela incorporação de antioxidantes naturais na matriz do polímero comestível utilizado. Do ponto de vista tecnológico, o agente é misturado com o polímero por dissolução em um solvente apropriado e a aplicação da solução segue mesmo princípio dos filmes comestíveis sem aditivos. A incorporação de extratos vegetais com atividade antioxidante em filmes comestíveis tem recebido grande atenção principalmente para auxiliar no armazenamento de alimentos, uma vez que podem melhorar as características mecânicas da embalagem e atuar como barreira ao oxigênio e à luz, aumentando a estabilidade à oxidação do alimento a ser embalado, que é um dos principais problemas que afetam sua qualidade (GÓMEZ-ESTACA et al, 2014; HAN et al., 2018; RANGARAJ et al., 2021). Diferentes antioxidantes naturais foram usados para aumentar as propriedades antioxidantes de filmes à base de proteína de soja, como extrato de uva vermelha (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2016), extrato de resíduo de alcaçuz (HAN; YU; WANG, 2018) e extrato de caroço de manga (MARYAM ADILAH; JAMILAH; NUR HANANI, 2018).

A *Portulaca oleracea* L., popularmente conhecida como beldroega, é uma planta espontânea (erva daninha) que pode ser encontrada em lavouras e gramados em todo o mundo, uma vez que cresce em diversas condições de solo e clima (KUMAR et al., 2022). A beldroega possui um alto teor de fitoquímicos, como flavonoides, alcalóides, terpenóides, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (como fósforo, cálcio, magnésio e zinco). Além disso, possui alto nível de ácidos graxos (principalmente ômega-3 e α -linolênico), que geralmente não são sintetizados em plantas terrestres, sendo, portanto, considerada um alimento nutritivo e medicinal (KUMAR et al., 2022; UDDIN et al., 2014). Há diversos estudos recentes que apresentam propriedades benéficas dessa planta, como antivirais (LI et al., 2019; LIU et al., 2021), anti-inflamatórias (MIAO et al., 2019) e antioxidantes (MA et al., 2020).

Pode-se encontrar na literatura vários estudos da aplicação de embalagens biodegradáveis ativas, que comprovam que os alimentos armazenados podem ser preservados devido ao potencial antioxidante dos filmes, no entanto, a maioria desses filmes são utilizados em óleos e carnes, como óleo de linhaça (SOUZA et al., 2020), óleo de pele de frango

(NILSUWAN et al., 2019), carne bovina (BERMÚDEZ-ORIA et al., 2019), filé de peixes (BARBOSA-PEREIRA et al., 2013; CAI; WANG; CAO, 2020) e sardinha (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012), ou ainda em frutas frescas, como morango (KANIKIREDDY et al., 2020; YAN et al., 2020), tomate (KAEWKLIN et al., 2018) e mirtilo (BANDYOPADHYAY et al., 2019; LU et al., 2021). Quanto ao armazenamento de frutas desidratadas, que possuem maior vida útil, até onde se tem conhecimento, há apenas um trabalho com uvas-passas que utilizou filme de poli(álcool vinílico) com adição de extrato de semente de uva, sendo que após 182 dias de armazenamento, as uvas que estavam nessas embalagens apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante que as armazenadas em polietileno (MIGLIORANZA et al., 2021).

A manga é considerada uma importante fruta em diversas partes do mundo, por possuir propriedades sensoriais agradáveis, como cor atrativa e sabor doce, além de importantes compostos antioxidantes, como carotenoides, ácido ascórbico e compostos fenólicos (PALAFOX-CARLOS; YAHIA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2012; SALGADO; GIRALDO; ORREGO, 2017). Devido ao curto período de amadurecimento, sua vida útil é limitada, portanto, métodos de conservação, como a secagem, são importantes para a conservação dessa fruta por mais tempo.

O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho de filmes biodegradáveis na forma de embalagem tipo sachê durante o armazenamento de *chips* de manga sob vácuo, utilizando filmes de proteína isolada de soja (SPI) e de proteína isolada de soja com alginato de sódio (SPI-ALG), ambos com adição de extrato de beldroega (SPI-EB e SPI-ALG-EB) em comparação ao polietileno de alta densidade (PEAD). Para tanto, as embalagens foram comparadas com base na permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio e na opacidade dos filmes, e sua eficácia sobre a qualidade da fruta foi avaliada através do conteúdo de nutrientes (conteúdo de β -caroteno e atividade antioxidante), além dos parâmetros de cor dos *chips* de manga determinados ao longo do período de armazenamento.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Materiais

Proteína isolada de soja (SPI) com teor de proteína de 91,14% (base seca), de cinzas 5,2% (base úmida) e de umidade 6,41% (base úmida) foi adquirida da empresa Ecil Ingredientes (São Paulo, Brasil), alginato de sódio (viscosidade 470 mPa·s) (GRINDSTED[®] Alginate FD

175) foi doado pela Danisco Brasil Ltda. Mangas (*Mangifera indica* L.) da cultivar Palmer, safra de 2020/2021, foram adquiridas na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo) de São José do Rio Preto – São Paulo.

Glicerol bidestilado utilizados nos filmes e os reagentes, grau PA, utilizados na análise de carotenoides foram da marca Synth. Para a quantificação da atividade antioxidante utilizou-se 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (TROLOX) da marca Sigma e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) da Chemicals.

5.2.2 Elaboração dos filmes

Foram elaboradas quatro formulações de filme biodegradável, a saber: à base de isolado proteico de soja (SPI), à base de SPI com adição de extrato de beldroega (SPI-EB), à base de SPI com adição de alginato de sódio (SPI-ALG) e à base de SPI com adição de ALG e EB (SPI-ALG-EB). Os filmes SPI, SPI-ALG, SPI-EB e SPI-ALG-EB foram elaborados conforme descrito no item 4.2.3 (Capítulo 4). A concentração de SPI foi de 5% (m/m) e a adição de ALG correspondeu a 1% (m/m). Para filmes com adição de extrato, dentre as concentrações de EB analisadas no Capítulo 4, selecionou-se a de 5% EB, que apesar de proporcionar filmes com maior solubilidade e permeabilidade ao vapor de água sem diferença estatística ($p < 0,05$) comparada as demais, foi a que proporcionou maior barreira à luz, maior resistência, além de alta atividade antioxidante aos filmes, quando comparada as demais formulações.

5.2.3 Propriedades dos filmes

5.2.3.1 Espessura

As medidas de espessura foram realizadas em pelo menos dez pontos aleatórios de cada formulação de filme utilizando um micrômetro digital (MDC-25SB, Mitutoyo, Japão).

5.2.3.2 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes biodegradáveis e do polietileno de alta densidade foi determinada segundo o método ASTM E 96-95 (ASTM E 96-95), utilizando gradiente de umidade relativa de 100-2%. Detalhes da análise e dos cálculos estão no item 3.2.3.10 do capítulo 3. No entanto, para o filme de polietileno, por apresentar baixa

permeabilidade ao vapor de água, os intervalos de pesagem e tempo total de análise foi maior, uma vez que as cápsulas foram pesadas a cada 12 h durante 5 dias.

5.2.3.3 Permeabilidade ao oxigênio

As taxas de permeabilidade ao oxigênio (TPO₂) foram determinadas pelo método coulométrico, segundo procedimento descrito na norma ASTM F 1927 (2020), em equipamento OXTRAN, modelo 2/22, da MOCON, operando com oxigênio puro como gás permeante. Os ensaios foram realizados a 23 °C e a 50% UR. Detalhes da análise e dos cálculos estão no item 3.2.3.13 do capítulo 3.

5.2.3.4 Opacidade

Para determinar a opacidade dos filmes foi utilizado um espectrofotômetro de bancada (HunterLab, ColorFlex, Estados Unidos). A opacidade foi determinada através da relação entre a opacidade do filme em um padrão preto (Y_p) e a opacidade do filme em um padrão branco (Y_b), Equação 5.1. As análises foram realizadas em triplicata e, para cada amostra, foram registrados valores para quatro diferentes posições.

$$\text{Opacidade} = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (5.1)$$

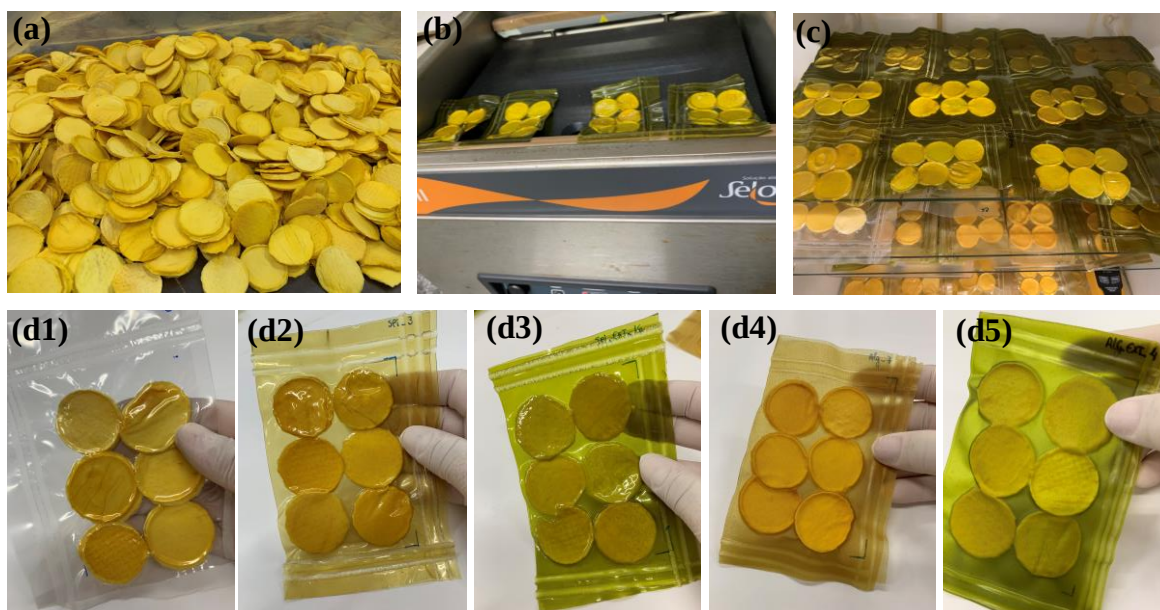
5.2.4 Preparo das embalagens e armazenamento

As mangas foram desidratadas segundo metodologia de Amado, Silva e Mauro (2020), à temperatura de 60,3 °C (±0,1) e umidade relativa de 12,13% (1,64), utilizando secadores de leito fixo com convecção forçada de ar aquecido com resistências elétricas. As mangas foram sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio (1% v/v) por 5 min, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Em seguida foram cortadas em fatias de espessura 0,55 ± 0,01 cm usando fatiador elétrico (Marca ECO, Brasil) e moldadas manualmente em círculos de 3,5 cm de diâmetro usando molde metálico. As mangas *in natura* apresentaram média de sólidos solúveis de 15,8 (± 0,9) e umidade inicial de 80,63% (± 0,50), e os pedaços de manga foram secos até umidade de 6,67% (± 0,59) e atividade de água de 0,396 (± 0,012) (Figura 5.1a). Após a secagem, os *chips* de manga foram acondicionados em uma mesma embalagem plástica e armazenados à temperatura ambiente e no escuro durante 15 dias, para equalização da umidade entre as amostras.

Os filmes foram cortados com dimensões 17×13 cm e foi realizada uma marcação de 1,5 cm nas laterais para selagem, ficando, portanto, uma área 14×10 cm com amostra. Em seguida, procedeu-se o envase a vácuo. O envase ocorreu de forma manual, adicionando-se 6 unidades de *chips* de manga em cada embalagem, que foi acomodada no equipamento de vácuo e selagem (Selovac, modelo 200SII, Brasil) como na Figura 5.1b, aplicando-se vácuo por 12 s.

Todas as embalagens foram envasadas no mesmo dia e armazenadas a 25 °C em câmaras de climatização BOD (BT 71, Biothec, Brasil) durante 100 dias (Figura 5.1c). Durante o estudo de armazenamento as BODs foram monitoradas quanto à umidade relativa (UR) em seu interior, o que resultou em uma média de UR de 51,58% ($\pm 6,62$). Na Figura 5.1d é possível verificar o aspecto de cada formulação de filme: d1 = PEAD, d2 = SPI, d3 = SPI-EB, d4 = SPI-ALG, d5 = SPI-ALG-EB. Foram retiradas embalagens, em triplicata para cada formulação, após 5, 10, 20, 40, 70 e 100 dias de armazenamento. A Figura D1, no Apêndice D, mostra as embalagens retiradas em cada dia de análise. No próximo tempo de análise, que seria de 150 dias, as amostras não se soltaram do filme, não sendo possível a realização das análises, o que pode ter sido provocado pelo forte contato da amostra com o filme, devido ao vácuo, assim como pela umidade relativa ambiente baixa, esta última reduzindo a flexibilidade dos filmes. Nos tempos descritos, as seguintes análises nos *chips* de manga foram realizadas: umidade, atividade de água, análise de cor, conteúdo de β -caroteno e atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH.

Figura 5.1 – Processo de envase e embalagens finais de cada formulação, sendo (a) *chips* de manga antes do envase, (b) envase a vácuo, (c) armazenamento em BOD, (d) embalagens após envase: 1 – PEAD, 2 – SPI, 3 – SPI-EB, 4 – SPI-ALG, (5) – SPI-ALG-EB.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.5 Análises da manga durante armazenamento

5.2.5.1 Umidade

A umidade foi determinada, em triplicata para amostras de cada embalagem, pelo método gravimétrico, com secagem em estufa a vácuo a 60 °C (modelo TE-395, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) conforme descrito na AOAC (2005).

5.2.5.2 Atividade de água

A atividade de água dos *chips* de manga foi determinada, em triplicata para amostras de cada embalagem, utilizando um analisador de atividade de água (AquaLab, 4TEV, EUA), a temperatura ambiente (25 °C)

5.2.5.3 Cor

Para determinar os parâmetros de cor das rodela de manga seca foi utilizado um espectrofotômetro de bancada (HunterLab, ColorFlex, Estados Unidos). As amostras foram acomodadas em um copo de vidro em algumas camadas, de maneira a não sobrar espaços não cobertos. Em seguida o copo de vidro foi tampado e coberto com um copo preto para a leitura da cor. O sistema utilizado foi o CIEL*a*b*, em que os parâmetros nele contidos são o L* (dimensão da claridade, sendo que L*=100 representa o branco e L* = 0 o preto), o a* (representa o valor entre o verde (- a*) e o vermelho (+ a*)), e o b* (representa o valor entre o azul (- b*) e o amarelo (+ b*)). As análises foram realizadas em triplicata para cada embalagem, sendo que para cada amostra a leitura foi registrada em quatro posições (ângulos de 0°, 90°, 180° e 270°), portanto para cada formulação 36 leituras foram obtidas. Além dos parâmetros L*, a* e b* os dados foram analisados através do C* (croma, que representa o grau de intensidade da cor), h (ângulo hue, que representa o grau de tonalidade) e DE* (diferença total de cor), definidos pelas Equações 5.2, 5.3 e 5.4 respectivamente:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (5.2)$$

$$h = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (5.3)$$

$$DE^* = \sqrt{(L^* - L^{*'})^2 + (a^* - a^{*'})^2 + (b^* - b^{*'})^2} \quad (5.4)$$

em que: L*', a*', b*' se referem aos parâmetros de cor da amostra inicial (tempo zero).

5.2.5.4 Carotenoides totais

O teor de carotenoides totais foi determinado, em duplicata para amostras de cada embalagem, de acordo com o método descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Os carotenoides foram extraídos com acetona de aproximadamente 2,5 g de amostra seca, utilizando um homogeneizador Turrtec (TE-102, Tecnal, Brasil) por cerca de 1 minuto. O homogeneizado foi filtrado a vácuo em funil com placa de vidro sinterizado (porosidade G2) e as extrações prosseguiram até o resíduo se apresentar destituído de cor, o que ocorreu após aproximadamente 4 extrações.

Em um funil de separação contendo aproximadamente 10 mL de éter de petróleo, foi adicionada uma porção do extrato de carotenoides em acetona, seguido de adição cuidadosa de água destilada (aproximadamente 400 mL). Após a separação das fases, a fase inferior, constituída de água e acetona, foi descartada. Em seguida, a fase etérea foi lavada cinco vezes com água destilada para a remoção completa da acetona. Após o descarte da água da última lavagem, o extrato etéreo foi recolhido em um balão volumétrico de 25 mL, fazendo-o passar por funil de vidro contendo algodão e uma pequena porção de sulfato de sódio anidro (~ 2 g) para remoção de eventual água residual. A absorbância no comprimento de onda de 450 nm (β -caroteno) foi medida em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific, GENESYS 10S UV-VIS, EUA). O teor de carotenoides totais das amostras, em $\mu\text{g/g}$, foi expresso como β -caroteno (C) e calculado utilizando o valor de absortividade ($A_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 2592, conforme Equação 5.5:

$$C (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{absorbância} \times \text{volume (mL)} \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{massa da amostra (g)}} \quad (5.5)$$

5.2.5.5 Atividade antioxidante

5.2.5.5.1 Extração dos compostos bioativos da manga

A extração dos compostos bioativos da manga foi realizada segundo Palafox-Carlos et al. (2012) com modificações. Primeiramente os *chips* de manga foram cortados em pedaços pequenos e pesaram-se amostras de 0,58 g. Em seguida, acrescentou-se 20 mL de solução extratora (metanol 80%) às amostras. A mistura foi agitada em homogeneizador Turrtec (TE-102, Tecnal, Brasil) durante 1 m à velocidade de 15000 rpm e, em seguida, levada a um banho de ultrassom (Q3.0/40A, Ultronique, Brasil) por 30 min à temperatura ambiente (25 °C). Por fim, os frascos foram dispostos em centrífuga (Z326K, Hermle, Alemanha), centrifugados a 7500 rpm por 25 min a 4 °C e os sobrenadantes coletados e armazenados a -18 °C para posterior

avaliação quanto à atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH. As extrações dos compostos bioativos foram realizadas em triplicata para cada formulação, uma vez que para cada ponto da cinética foram retiradas três embalagens de cada tratamento.

Em ensaios preliminares, três diferentes soluções aquosas foram testadas para o estabelecimento da melhor solução extratora para a manga seca: acetona 80%, etanol 80% e metanol 80%. Resultados dos testes de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH com diferentes soluções extratoras estão apresentados no Apêndice E (Tabela E1). Através desses ensaios selecionou-se a solução aquosa de metanol 80%, que apresentou extração mais eficiente dos compostos antioxidantes por ambos os métodos.

5.2.5.5.2 Determinação da Atividade antioxidante (AA) pelo método ABTS

A atividade antioxidante total dos *chips* de manga foi determinada pelo método de captura do radical ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) de acordo com a metodologia proposta por Rufino et al. (2007b). As leituras de absorbância foram feitas a 734 nm em espectrofotômetro UV-VIS (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA). A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração preparada com uma solução padrão de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico). A atividade antioxidante total foi expressa em μM de trolox $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de *chips* de manga. As análises foram realizadas em triplicata para cada extrato.

5.2.5.5.3 Determinação da Atividade antioxidante (AA) pelo método DPPH

A atividade antioxidante total dos *chips* de manga também foi determinada pelo método baseado na captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), utilizando-se uma solução de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) para construção da curva padrão. As leituras de absorbância foram feitas a 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram expressos em μM de trolox $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de *chips* de manga. As análises foram realizadas em triplicata para cada extrato.

5.2.6 Cinética de reação

Os dados obtidos dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h e DE^*), do conteúdo de β -caroteno e de atividade antioxidante (pelos métodos ABTS e DPPH) foram analisados quanto à ordem de reação de degradação e as velocidades de reação (k) calculadas. A variação da

diferença total de cor (DE*) foi representada pelo modelo de cinética de ordem zero (Equação 5.6), enquanto a variação dos parâmetros de cor L*, b*, C* e h, conteúdo de β -caroteno e AA pelo método DPPH foram descritos pelo modelo de cinética de segunda ordem (Equação 5.7).

$$A = \pm kt + A_0 \quad (5.6)$$

$$\frac{1}{A} = \pm kt + \frac{1}{A_0} \quad (5.7)$$

em que A se refere ao valor do fator em análise em função do tempo t (dia) e k é a constante de velocidade de reação, em que a unidade depende da unidade do fator A.

5.2.7 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e as médias avaliadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ao nível de significância de 0,05, utilizando software Minitab® 16.2.0.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Propriedades de barreira dos filmes

Na Tabela 5.1 estão apresentadas as espessuras e propriedades de barreira (ao vapor de água, ao oxigênio e à luz) dos filmes biodegradáveis e do polietileno de alta densidade (PEAD) utilizados como embalagens para *chips* de manga.

A espessura não variou entre as formulações à base de biopolímeros, no entanto, estas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparadas ao PEAD, sendo mais de 2× maior.

Pela análise de permeabilidade ao vapor de água notou-se que o polietileno de alta densidade (PEAD) apresentou média significativamente menor ($p < 0,05$) que os demais filmes. Entre os filmes biodegradáveis não houve diferença significativa ($p < 0,05$). Vale ressaltar que, visando a utilização de filmes biodegradáveis para embalagens de alimentos, é desejável uma baixa permeabilidade ao vapor de água, o que pode contribuir para conservação e segurança dos alimentos, e a obtenção de propriedades de barreira à água que se assemelhem aos filmes à

base de petróleo ainda é um desafio a ser superado na área de desenvolvimento de embalagens à base de biopolímeros (MIGLIORANZA et al., 2021).

Analizando-se a permeabilidade ao oxigênio, observou-se que o PEAD apresentou média significativamente maior ($p < 0,05$) que os demais, enquanto os filmes biodegradáveis que contêm ALG foram os que apresentaram menor permeabilidade ao gás ($3,14 \times 10^{-16}$ sem extrato e $2,55 \times 10^{-16}$ g·m/ Pa·s·m² com adição do EB), significativamente menor ($p < 0,05$) comparados aos filmes de SPI e SPI-EB. Ao comparar o filme de PEAD com o de SPI-ALG-EB obtém-se uma barreira cerca de 3× mais efetiva para o filme biodegradável. Em relação à adição do extrato foi possível notar que este não alterou significativamente ($p < 0,05$) a barreira ao oxigênio, tanto do filme simples (SPI) quanto do filme composto (SPI-ALG). No caso dos filmes compostos, houve uma redução na média de cerca de 19% com adição do EB, no entanto, não foi significativamente diferente ($p < 0,05$). Vidal et al. (2022) analisaram permeabilidade ao oxigênio de filme de carboximetilcelulose (CMC) com glicerina e lecitina, e compararam com aqueles adicionados de extrato da torta de prensagem do óleo de café e do sedimento obtido após clarificação do óleo de café, e, assim como no presente estudo, não obtiveram diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao filme controle (sem adição dos extratos).

Devido aos baixos valores de permeabilidade ao oxigênio das embalagens comestíveis analisadas, pode-se avaliar esses filmes como uma boa alternativa para embalagens de produtos alimentícios que apresentem compostos sensíveis à oxidação, fator determinante na vida útil de produtos alimentícios (SILVA et al., 2021; VIDAL et al., 2022). No entanto, é importante destacar que esses valores foram obtidos para condição de umidade relativa de 50%, uma vez que, devido à natureza hidrofílica do SPI e do ALG, umidades relativas mais altas podem modificar a estrutura da cadeia polimérica e aumentar os valores de permeabilidade ao oxigênio (GONTARD et al., 1996).

Observando os dados de opacidade, verificou-se que o filme composto com adição de extrato (SPI-ALG-EB) apresentou a menor transparência, sendo quase sete vezes menor comparada à do PEAD. Os filmes SPI e SPI-EB apresentaram opacidade sem diferença significativa ($p < 0,05$) e, ambas, significativamente menores às dos filmes biodegradáveis que contêm ALG. Os filmes biodegradáveis com adição ALG foram os que apresentam maior opacidade, enquanto o filme à base de petróleo foi o que apresentou a menor barreira à luz, significativamente menor ($p < 0,05$) que os demais. Apesar de uma maior transparência ser desejável para aplicação de filmes como embalagem de alimentos, uma vez que o consumidor poderá visualizar o produto, uma maior opacidade pode ser benéfica para conservação de alimentos, protegendo-os de reações de degradação provocadas pela luz (SILVA et al., 2016).

Portanto, espera-se maior proteção à luz aos alimentos em embalagens constituídas pelos biopolímeros avaliados, principalmente com adição de ALG, em comparação com o polietileno de alta densidade (PEAD).

Tabela 5.1 – Espessuras (mm), permeabilidade ao vapor de água ($\text{g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$) e ao oxigênio (PO_2) e opacidade dos filmes de SPI (5%) e SPI (5%)-ALG (1%), ambos sem e com adição de EB (5%), e do filme de polietileno de alta densidade (PEAD).

Formulação	Espessura (mm)	PVA $\times 10^{10}$ ($\text{g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$)*	$\text{PO}_2 \times 10^{16}$ ($\text{g/Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$)	Opacidade*
SPI	$0,193 \pm 0,036^a$	$5,40 \pm 1,67^a$	$5,52 \pm 0,40^b$	$4,98 \pm 0,21^c$
SPI-EB	$0,198 \pm 0,051^a$	$6,85 \pm 2,15^a$	$5,51 \pm 0,64^b$	$4,48 \pm 0,48^c$
SPI-ALG	$0,229 \pm 0,021^a$	$6,48 \pm 0,46^a$	$3,14 \pm 0,38^c$	$14,44 \pm 0,25^b$
SPI-ALG-EB	$0,224 \pm 0,019^a$	$5,90 \pm 0,75^a$	$2,55 \pm 0,16^c$	$19,14 \pm 0,93^a$
PEAD	$0,079 \pm 0,002^b$	$0,00681 \pm 0,00111^b$	$7,85 \pm 0,15^a$	$2,81 \pm 0,08^d$

Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão)

a,b,c,d Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

*Resultados de permeabilidade ao vapor de água e opacidade dos filmes biodegradáveis foram retirados do capítulo IV.

5.3.2 Umidade e atividade de água da manga

Na Figura 5.2a estão apresentados os valores de umidade e na Figura 5.2b os valores de atividade de água, ambos para as amostras de *chips* de manga armazenadas nas diferentes embalagens biodegradáveis analisadas (SPI, SPI-EB, SPI-ALG e SPI-ALG-EB) e no PEAD, durante os 100 dias de estocagem à 25 °C.

Na Figura 5.2a nota-se que houve um aumento significativo na umidade das amostras acondicionadas em todas as embalagens já nos primeiros 5 dias de armazenamento, sendo a umidade dos *chips* de manga significativamente maior ($p < 0,05$) até mesmo para as embaladas no PEAD, embalagem que após os 5 dias de armazenamento conseguiu manter a umidade sem alterações significativas até os 100 dias de estocagem à 25 °C. No período de 5 à 40 dias de armazenamento observaram-se valores de umidade significativamente maiores que os iniciais ($p < 0,05$), nos *chips* de manga acondicionados nos filmes biodegradáveis, o que seria esperado devido à menor barreira ao vapor de água dessas embalagens, cerca de 900× menor que a embalagem de PEAD (Tabela 5.1). No entanto, essa diferença entre a embalagem à base de petróleo e aquelas à base de biopolímeros ocorreu com as mangas armazenadas somente até 40 dias, uma vez que com 70 e 100 dias de armazenamento, as amostras das embalagens

biodegradáveis apresentaram redução da umidade, se igualando àquelas da embalagem de PEAD.

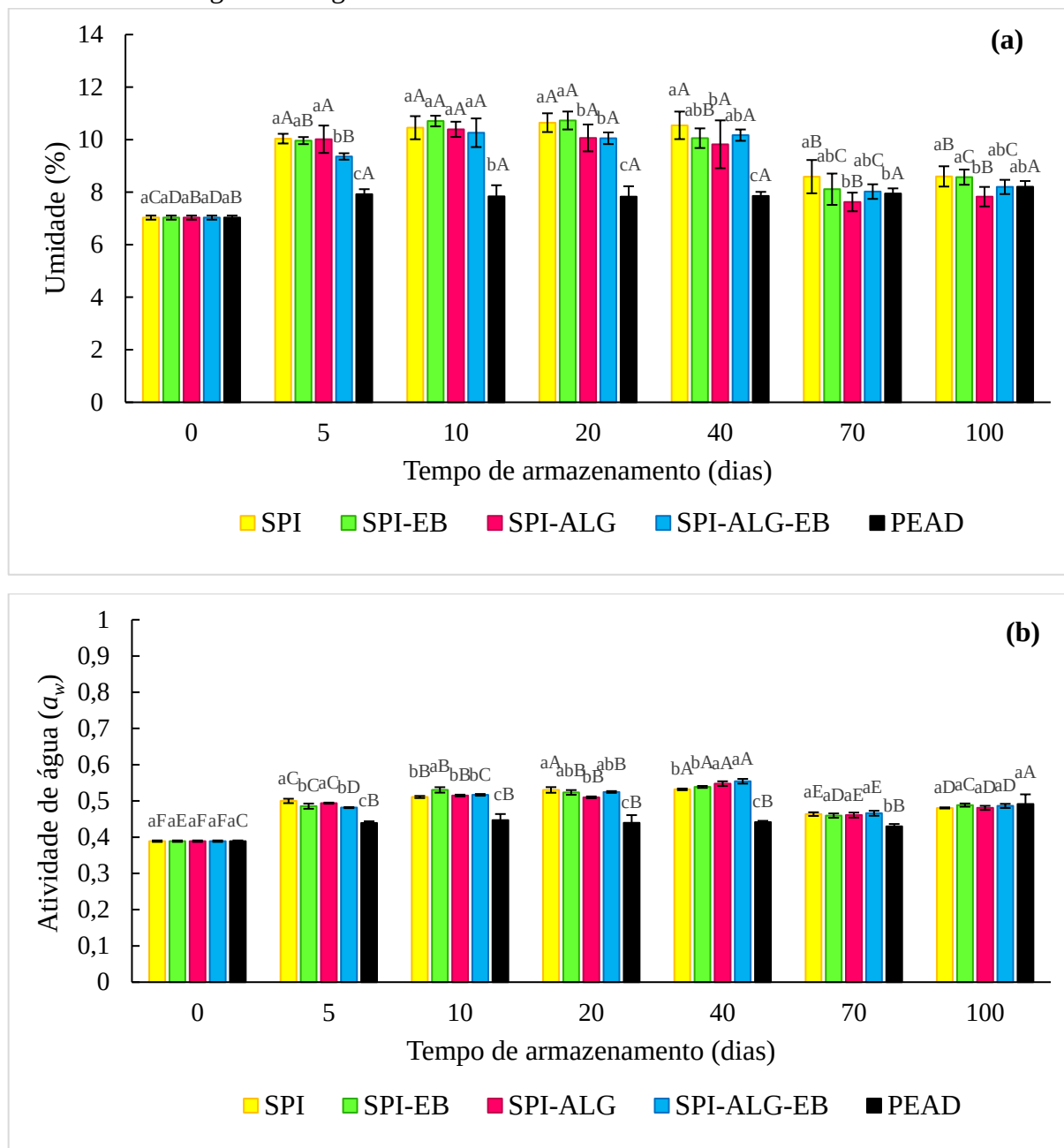
É importante notar que, embora os *chips* de manga acondicionadas em filmes biodegradáveis tenham obtido maior aumento de umidade em relação às mantidas no PEAD, principalmente no início (Figura 5.2a), elas permaneceram abaixo de 11 g/100 g durante todo período de armazenamento, valor inferior ao teor de água inicial dos filmes biodegradáveis, que foi em torno de 15 g/100 g (Item 4.3.6 do Capítulo 4). As amostras permaneceram em valores mais altos até as medidas feitas aos 40 dias. Com 70 e 100 dias, todas as amostras apresentaram umidade mais baixa e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as embalagens. Esse fato sugere que as condições ambientais afetaram o conteúdo de água do filme e das amostras, sendo que vale ressaltar que a permeabilidade ao vapor de água das embalagens biodegradáveis é afetada pela umidade relativa do ambiente (BRANDELERO; YAMASHITA; GROSSMANN, 2010).

A atividade de água das amostras (Figura 5.2b) poderia explicar as variações observadas no conteúdo de umidade, uma vez que elas foram afetadas pela embalagem, que inicialmente apresentava atividade de água superior, em torno de 0,53 (UR de equilíbrio dos filmes, antes da embalagem). Notou-se aumento de a_w logo nos primeiros 5 dias de armazenamento em todas as amostras, o que pode estar relacionado em parte às embalagens biodegradáveis, mas também pelas amostras não terem atingido totalmente um equilíbrio no armazenamento prévio de 15 dias, ou ainda à manipulação das amostras durante o envase, uma vez que também houve aumento na umidade da amostra em PEAD. Após 70 dias de armazenamento observou-se redução da atividade de água, o que indicaria a influência da umidade relativa do ambiente, no caso uma redução da umidade relativa.

Durante os 100 dias de armazenamento a atividade de água das amostras se manteve dentro da faixa de 0,4 a 0,6, indicando segurança quanto à proliferação microbiana, uma vez que valores de atividade de água abaixo de 0,65 reduz ou impede o crescimento de microrganismos (LABUZA, 1977). Os filmes também mantiveram flexibilidade e não aderiram às amostras.

Após 150 dias de armazenamento, os filmes sofreram alterações, apresentando-se aderidos às amostras e tornando-se quebradiços. A umidade relativa no último mês de armazenamento (julho de 2021) atingiu valores extremamente baixos, que se refletiu em uma média em torno de 35% de UR. Tais alterações foram atribuídas a esse fato, mas seriam necessários estudos comparativos de armazenamento sem aplicação de vácuo e em várias condições ambientais para elucidar essas questões.

Figura 5.2 – Umidade (a) e atividade de água (b) dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre amostras das diferentes embalagens no mesmo dia de acordo com teste de Tukey e letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento de uma mesma embalagem de acordo com teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.3 Cor da manga

Na Tabela F1 (Apêndice F) estão apresentadas as médias e desvios dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE) para os *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens

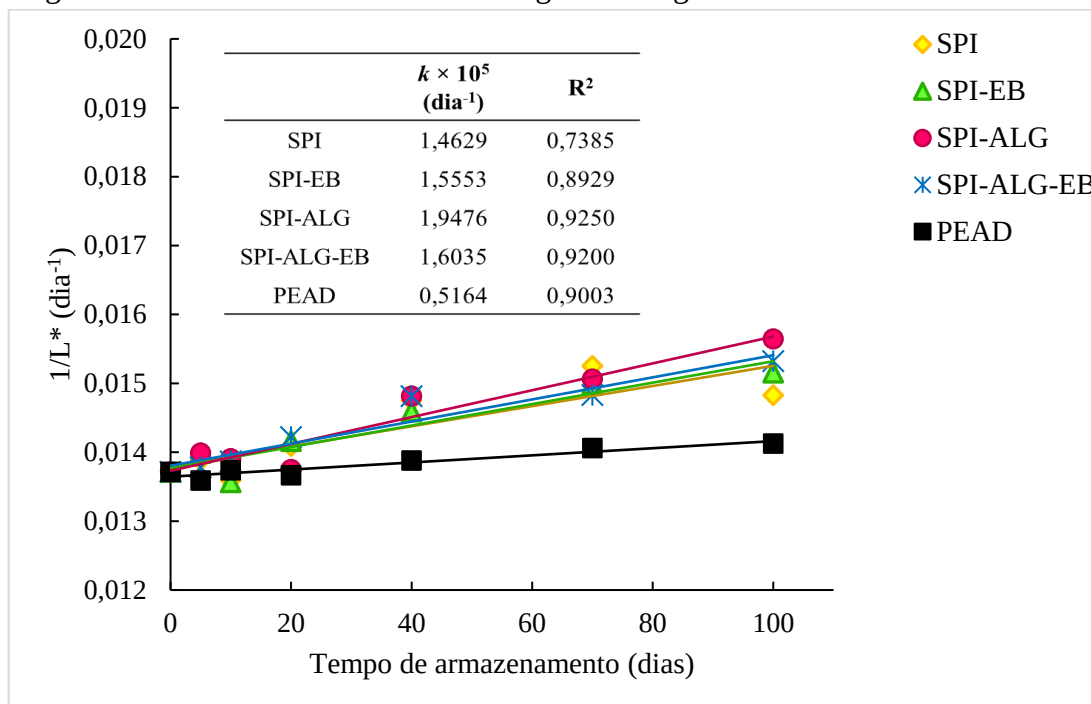
em estudo (SPI, SPI-EB, SPI-ALG, SPI-ALG-EB e PEAD), a cada tempo de análise (0, 5, 10, 20, 40, 70 e 100 dias).

A dimensão da claridade (L^*) das amostras iniciais foi de $72,91 \pm 1,36$, e as amostras da embalagem de PEAD foi a que apresentou menor alteração após 100 dias de armazenamento (valor médio de $L^* = 70,78$). As embalagens biodegradáveis, no entanto, provocaram maiores alterações no parâmetro L^* dos *chips* de manga, atingindo valor médio entre as formulações de 65,65 após final do período analisado, tornando os *chips* de manga, portanto, ligeiramente mais escuros (Tabela F1).

A cinética de escurecimento para as amostras das diferentes embalagens foi bem descrita por uma reação de segunda ordem, e os valores das constantes de velocidade de reação (k) e os coeficientes de determinação (R^2) estão apresentados na Figura 5.3. Com exceção das amostras do filme de SPI, que apresentou $R^2 = 0,78$, todas as outras tiveram ajustes com valores de R^2 acima de 0,89. Quanto à taxa de reação, notou-se que o menor valor foi determinado para as amostras do filme de PEAD, na ordem de 10^{-6} , enquanto aquelas das embalagens à base de biopolímeros apresentaram valores na faixa de 10^{-5} (k entre 1,46 e $1,95 \times 10^{-5} \text{ dia}^{-1}$ para SPI e SPI-ALG respectivamente). As amostras que apresentaram maior escurecimento foram aquelas armazenadas em formulações com adição de ALG, o que poderia estar associado a uma maior aderência dos *chips* de manga à superfície do filme após aplicação do vácuo e uma eventual interação entre amostra e filme.

O valor inicial do parâmetro a^* dos *chips* de manga foi $12,52 \pm 1,57$, e variou de 11,87 a 15,61 entre amostras das diferentes embalagens e dias de armazenamento, não apresentando uma tendência clara e, portanto, não permitindo ajuste de modelos de cinética de reação. No entanto, no geral, maiores valores foram obtidos para as amostras armazenadas nos filmes com adição de ALG, principalmente no de SPI-ALG, que durante a maioria dos dias analisados apresentou valores iguais ou maiores a 14 (Tabela F1), portanto, tendendo ao vermelho.

Figura 5.3 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro L^* de cor dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.



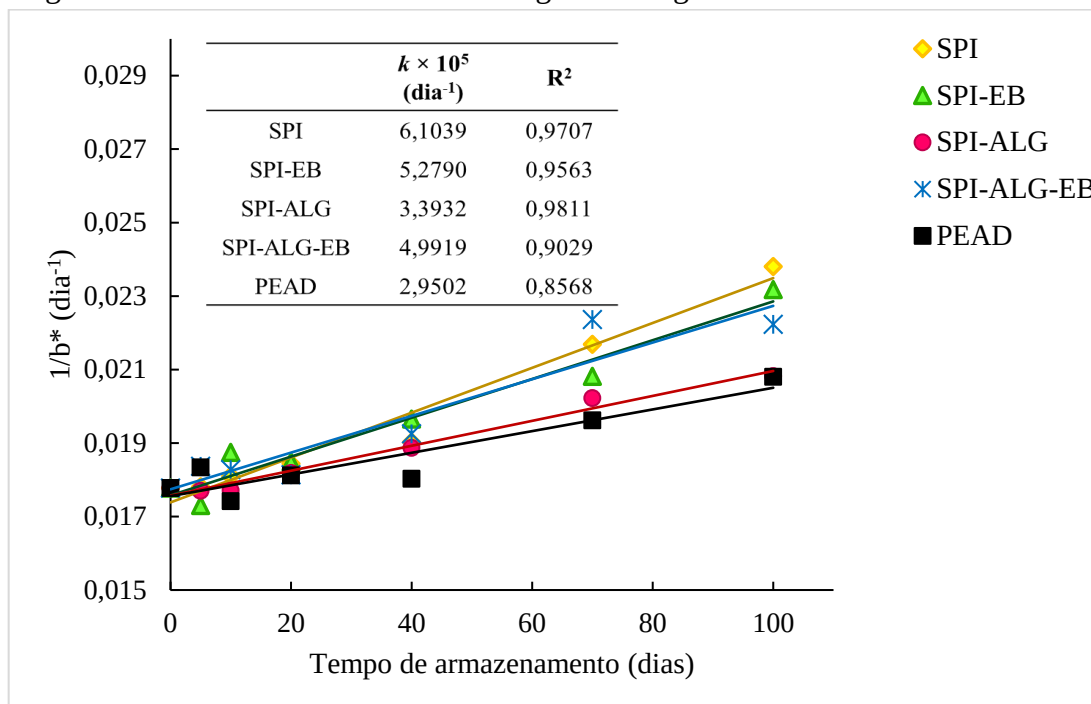
Fonte: Elaborado pelo autor

O valor inicial do b^* dos *chips* de manga foi de $56,25 \pm 3,30$, e observou-se que este sofreu redução ao longo do armazenamento, para as amostras de todas as embalagens em estudo. O menor valor, após os 100 dias de armazenamento, corresponde às amostras armazenadas no filme somente de SPI ($42,01 \pm 1,96$) (Tabela F1).

Assim como o parâmetro L^* , o b^* foi bem descrito por uma reação de segunda ordem, e os valores das constantes de velocidade e dos coeficientes de determinação estão apresentados na Figura 5.4. Quanto ao R^2 , este foi de 0,86 para as amostras do PEAD e acima de 0,90 para as amostras das embalagens biodegradáveis.

O filme elaborado apenas com SPI foi o que apresentou maior taxa de redução de b^* durante armazenamento ($k = 6,10 \times 10^{-5} \text{ dia}^{-1}$), cerca de 2× maior que a constante obtida para as amostras do PEAD ($k = 2,95 \times 10^{-5} \text{ dia}^{-1}$), e dentre as embalagens biodegradáveis as amostras armazenadas na de SPI-ALG foram as que tiveram menor taxa de redução ($k = 3,39 \times 10^{-5} \text{ dia}^{-1}$).

Figura 5.4 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro b^* de cor dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.

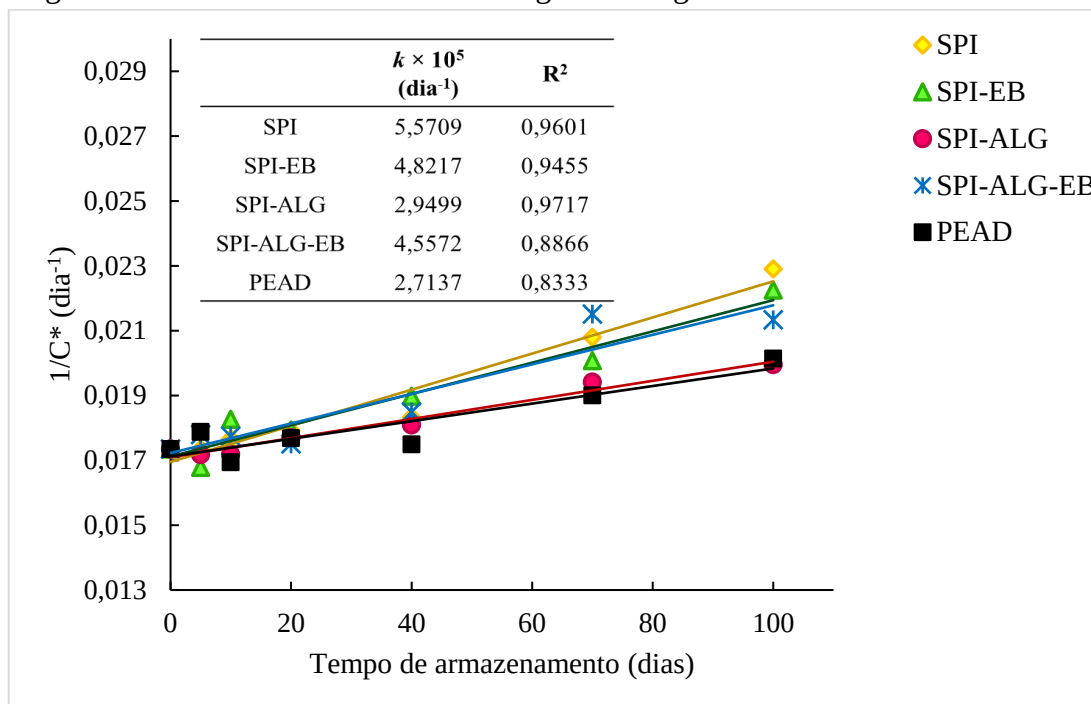


Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação ao parâmetro de cor C^* (croma), que representa a intensidade da cor, verificou-se que seu valor inicial foi de $57,64 \pm 3,49$, sofrendo redução de 43,66 (amostras do SPI) a 50,11 (amostras do SPI-ALG), após 100 dias de armazenamento à temperatura de 25 °C (Tabela F1).

O modelo de segunda ordem também foi adequado para representar a redução desse parâmetro (Figura 5.5), com coeficientes de determinação maiores que 0,83. As amostras armazenadas na embalagem somente de SPI foram as que apresentaram a maior constante de velocidade de reação ($k = 5,57 \times 10^{-5} \text{ dia}^{-1}$), influenciada pela maior redução do parâmetro b^* dessas amostras, uma vez que C^* é calculado em função dos parâmetros de cor a^* e b^* (Equação 5.2). Por sua vez, os *chips* de manga armazenados em PEAD apresentaram a menor taxa de redução ($k = 2,71 \times 10^{-5} \text{ dia}^{-1}$), relacionada à menor diminuição de b^* nessas amostras.

Figura 5.5 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro C^* de cor dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.

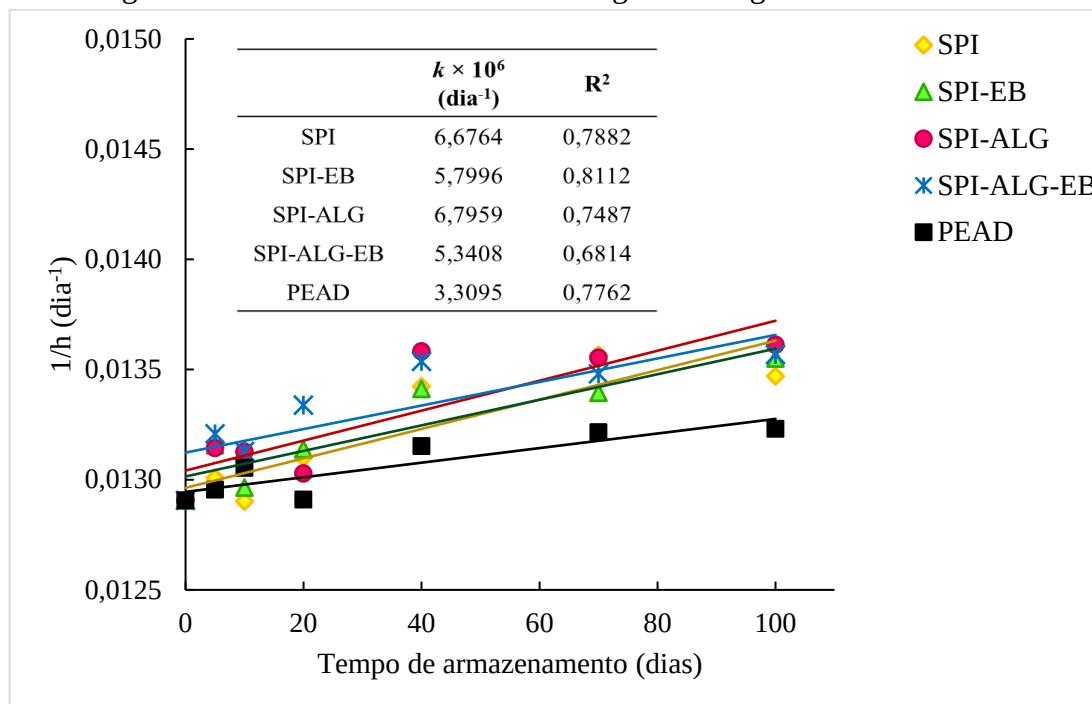


Fonte: Elaborado pelo autor

O valor do ângulo Hue (h) inicial dos *chips* de manga foi de $77,48 \pm 1,12$, e apresentou pequeno decréscimo com o tempo de armazenamento, atingindo valores de 73,46 (SPI-ALG) a 75,58 (PEAD) (Tabela F1), o que significa que as amostras de todas as embalagens analisadas apresentaram leve redução da tonalidade amarelo-alaranjada, tornando-se ligeiramente mais alaranjadas com o tempo.

Os resultados do ângulo hue foram descritos pelo modelo de reação de segunda ordem (Figura 5.6), e obtiveram coeficientes de determinação entre 0,68 (SPI-ALG-EB) e 0,81 (SPI-EB). Assim como os demais parâmetros de cor, as amostras armazenadas no PEAD apresentaram menor velocidade de reação ($k = 3,31 \times 10^{-6} \text{ dia}^{-1}$, $R^2 = 0,78$). Entre as amostras armazenadas nos filmes biodegradáveis, as dos filmes de SPI e SPI-ALG foram as que apresentaram maior taxa de decréscimo do ângulo hue, com valores de k bem próximos ($6,68 \times 10^{-6}$ e $6,80 \times 10^{-6} \text{ dia}^{-1}$ respectivamente), e, portanto, as amostras dos filmes com adição de EB foram as que mais mantiveram a tonalidade da cor amarelo-alaranjada entre os filmes biodegradáveis.

Figura 5.6 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração do parâmetro h (hue) da cor dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.

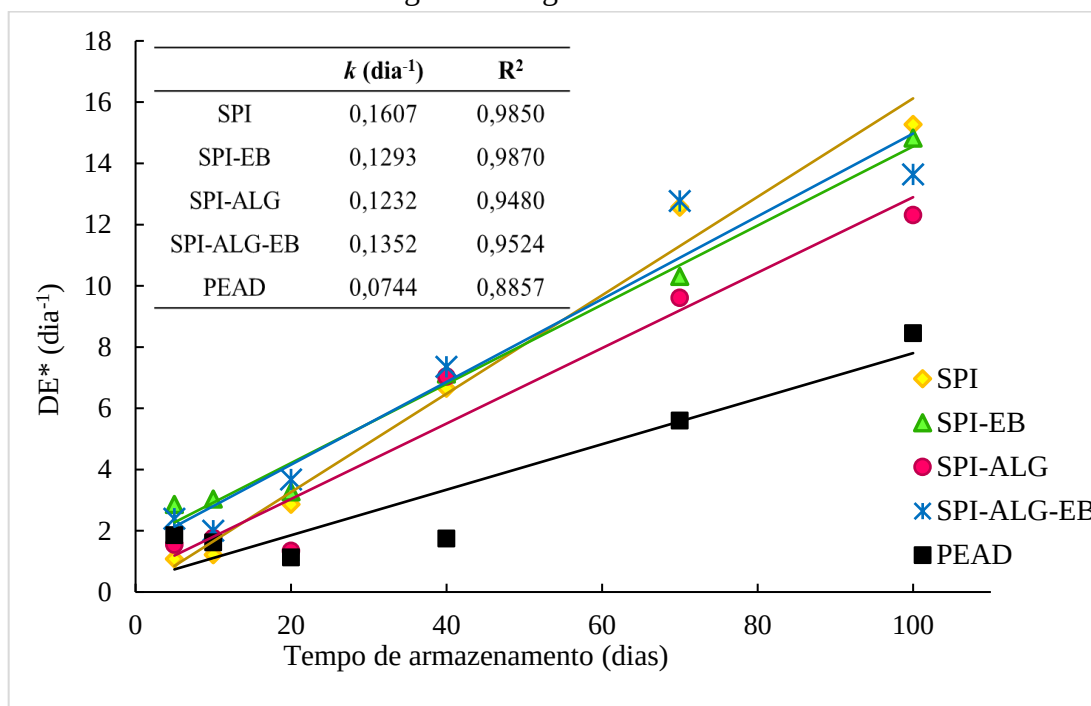


Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados foram também analisados pelo parâmetro da diferença total de cor (DE^*) de acordo com a Equação 5.4, que representa a alteração de cor em relação à amostra inicial, e verificou-se que o modelo cinético de ordem zero se ajustou aos dados, apresentando valores de R^2 entre 0,8857 (PEAD) e 0,9870 (SPI-EB) (Figura 5.7).

Analisando-se as constantes de degradação (k) observou-se que as amostras do PEAD foram as que apresentaram menor constante de velocidade ($k = 0,0744 \text{ dia}^{-1}$). Entre as embalagens biodegradáveis, aquelas armazenadas nos filmes à base de SPI-EB e SPI-ALG foram as que apresentaram as menores constantes de reação ($k = 0,1293 \text{ dia}^{-1}$ e $0,1232 \text{ dia}^{-1}$ respectivamente), enquanto a embalagem apenas de SPI foi a que apresentou a maior constante ($k = 0,1607 \text{ dia}^{-1}$), sendo a responsável, portanto, pela maior taxa de diferença total de cor dos *chips* de manga.

Figura 5.7 – Modelo cinético de ordem zero da diferença total de cor (DE*) dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.



Fonte: Elaborado pelo autor

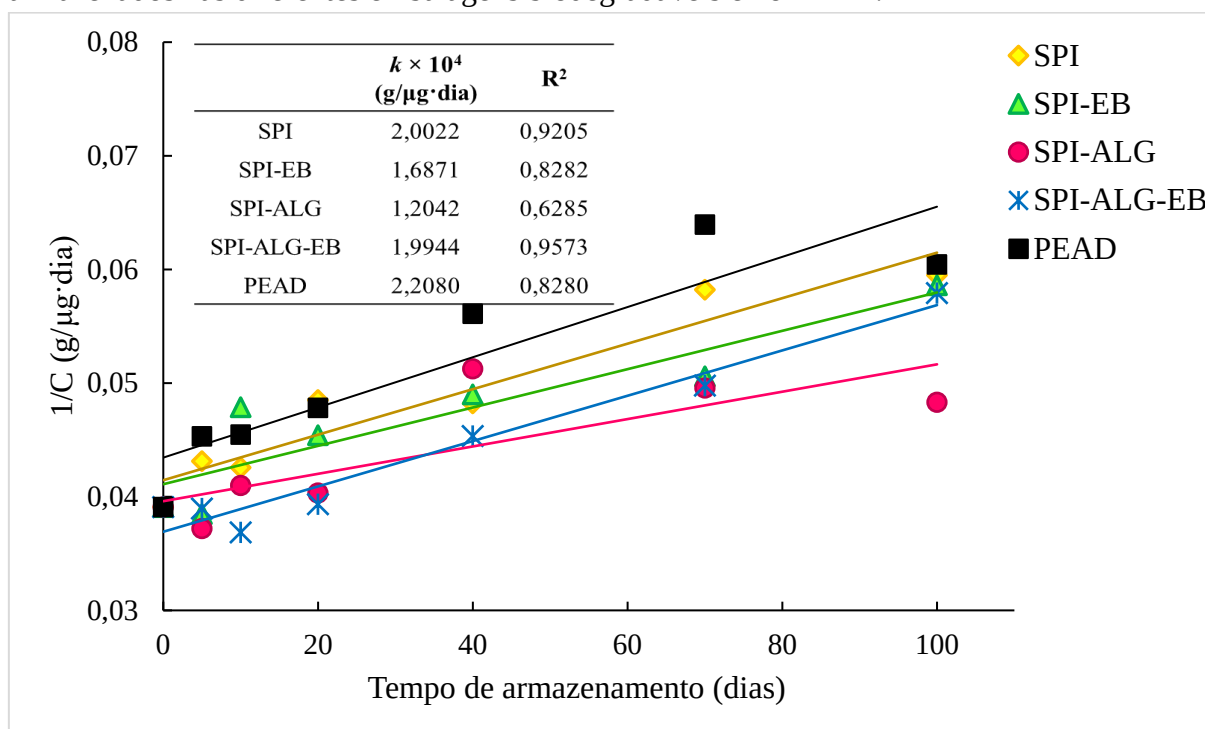
5.3.4 Conteúdo de β -caroteno das mangas

Os conteúdos de β -caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de *chips* de manga) para as amostras armazenadas à 25 °C nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante 100 dias de armazenamento estão apresentados no Apêndice F (Tabela F2). O teor inicial de β -caroteno nos *chips* de manga foi de $25,58 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($\pm 1,40$), resultado próximo ao encontrado por Amado, Silva e Mauro (2020) para manga Palmer seca à 60 °C (média de $28,55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ entre repetições de secagem). Os carotenoides são conhecidos por serem altamente suscetíveis à oxidação, tanto enzimática quanto não-enzimática (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). No entanto, como as amostras foram armazenadas em ausência de oxigênio e luz, fatores estes que aceleram reações de oxidação, assim como à temperatura ambiente (25 °C), não houve altas taxas de degradação com o período de armazenamento, atingindo valores de β -caroteno entre $16,55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (amostras armazenadas no PEAD) e $20,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (amostras armazenadas no filme biodegradável SPI-ALG) após os 100 dias de armazenamento. No entanto, diferenças na taxa de perda desses compostos puderam ser visualizadas em função da embalagem utilizada no armazenamento.

A cinética de degradação do β -caroteno para as amostras das diferentes embalagens foi bem descrita por uma reação de segunda ordem (Figura 5.8). Observou-se que a constante de velocidade da reação (k) foi da ordem de 10^{-4} para todas as amostras e foi maior para as mangas armazenadas no PEAD ($k = 2,21 \times 10^{-4} \text{ g}/\mu\text{g}\cdot\text{dia}$, $R^2 = 0,8280$), o que provavelmente ocorreu devido ao maior valor de permeabilidade ao oxigênio dessas embalagens (Tabela 5.1).

Dentre os filmes biodegradáveis, os elaborados apenas com SPI e com os três componentes (SPI-ALG-EB) foram os que ocasionaram maiores taxas de degradação de β -caroteno dos *chips* de manga com o tempo, com valores de constante de degradação (k) bem próximos, de $2,00$ e $1,99 \times 10^{-4} \text{ g}/\mu\text{g}\cdot\text{dia}$, respectivamente. As amostras armazenadas no filme SPI-ALG foram as que apresentaram a menor constante de reação ($k = 1,20 \times 10^{-4} \text{ g}/\mu\text{g}\cdot\text{dia}$, $R^2 = 0,6285$), o que pode ser devido à menor permeabilidade ao oxigênio desse filme (Tabela 5.1), que teria dificultado a transferência de oxigênio e protegido os *chips* de manga de reações de degradação do β -caroteno (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014).

Figura 5.8 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração de β -caroteno dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.



Fonte: Elaborado pelo autor

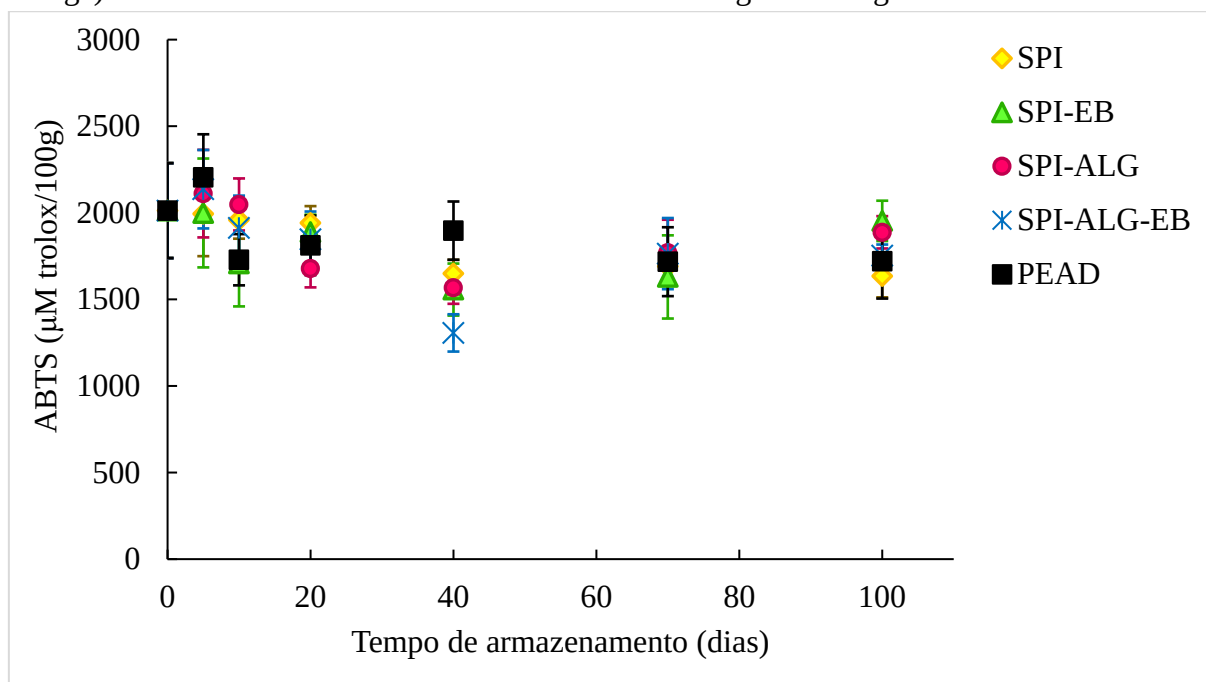
5.3.5 Atividade antioxidante da manga

A Figura 5.9 apresenta os dados de atividade antioxidante dos *chips* de manga utilizando o método ABTS, e na Figura 5.10 estão apresentados os modelos de cinética de segunda ordem para AA pelo método DPPH. As médias e os desvios-padrão obtidos por ambos os métodos se encontram na Tabela F3 (Apêndice F).

A atividade antioxidante inicial pelo método ABTS foi de 2012,60 μM de trolox $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de *chips* de manga ($\pm 274,16$) e apresentou pequenas alterações durante o armazenamento, variando com o período analisado e entre as embalagens utilizadas. Após os 100 dias de armazenamento, atingiu valores entre 1635,04 (SPI) e 1953,44 (SPI-EB), que representam reduções de aproximadamente 19 e 3%, respectivamente.

Observou-se um pequeno aumento da atividade antioxidante dos *chips* de manga nos primeiros 5 dias de armazenamento, o que provavelmente se deve à amostragem ou erros experimentais, e uma redução perceptível com 10 dias de armazenamento. Após 10 dias de armazenamento é possível notar que a capacidade antioxidante determinada pela captura do radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ praticamente se manteve durante todo o período analisado.

Figura 5.9 – Atividade antioxidante pelo método ABTS (μM de trolox $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de *chips* de manga) das amostras armazenadas nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.



Fonte: Elaborado pelo autor

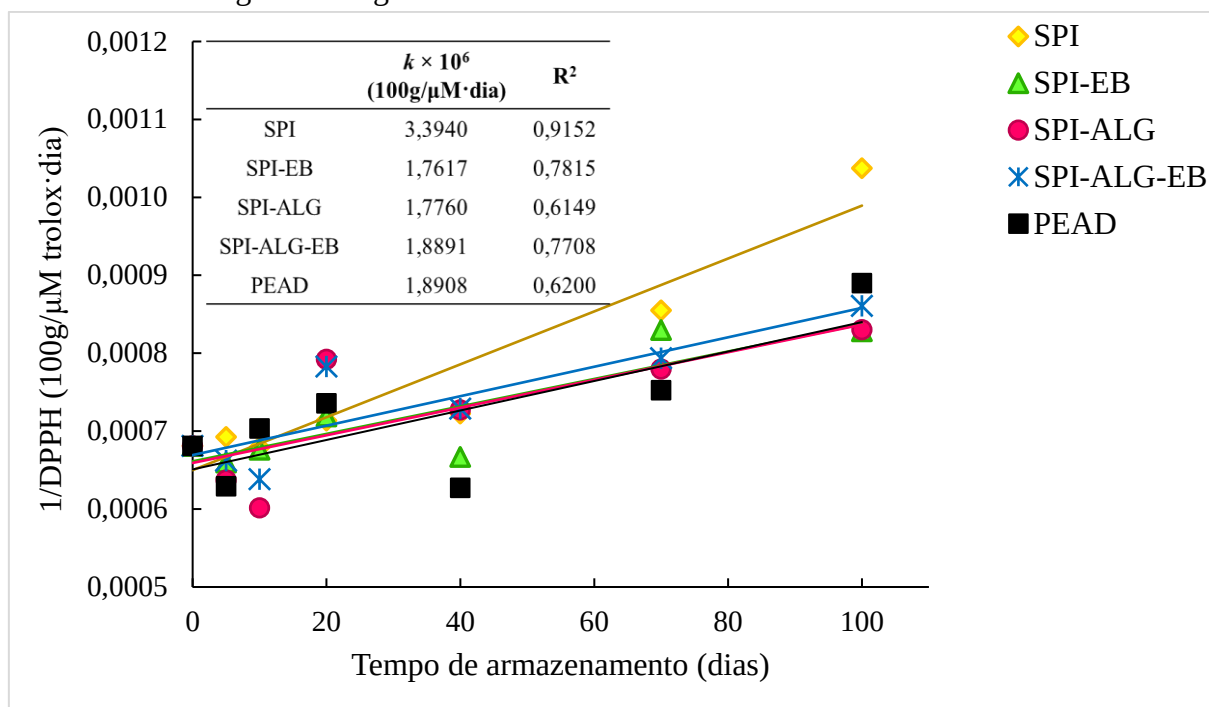
A atividade antioxidante inicial dos *chips* de manga pelo método DPPH foi de 1468,25 μM de trolox $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de *chips* de manga ($\pm 48,07$) (Tabela F3), sendo os resultados pelo método DPPH menores em relação ao ABTS. Isso pode ter ocorrido pelo fato de o DPPH não detectar atividade antioxidante referente aos carotenoides, como verificado por Müller, Fröhlich e Böhm (2011).

A partir da análise de atividade antioxidante pelo método DPPH (Figura 5.10) observou-se uma redução da AA dos *chips* de manga com 70 dias de armazenamento, em todas as embalagens analisadas. Comparando-se as diferentes embalagens após os 100 dias de armazenamento, observou-se que as amostras da embalagem à base somente de SPI apresentaram menor média que as demais, com redução de 34% na atividade antioxidante. As amostras das embalagens SPI-EB e SPI-ALG foram as que apresentaram menor redução, de aproximadamente 18%.

Embora a embalagem a vácuo combinada com uma boa barreira de oxigênio do filme de embalagem possa limitar a presença de oxigênio, sabe-se que tais técnicas não removem completamente o O_2 dentro da embalagem, uma vez que há certa permeabilidade ao O_2 pelas embalagens, além de possível O_2 residual no momento do envase ou vedação deficiente que permita que o O_2 do exterior entre em contato com a amostra (HAN et al., 2018).

Os resultados da capacidade antioxidante pelo radical DPPH foram representados pelo modelo de cinética de segunda ordem, apresentando coeficientes de determinação entre 0,61 (SPI-ALG) e 0,92 (SPI). As constantes de velocidade foram baixas, da ordem de 10^{-6} . Com exceção das amostras armazenadas nos filmes somente de SPI, em que $k = 3,39 \times 10^{-6} 100\text{g} \cdot (\mu\text{M trolox} \cdot \text{dia})^{-1}$, as demais apresentaram constante de velocidade de reação muito próximas, entre $1,76 \times 10^{-6}$ e $1,89 \times 10^{-6} 100\text{g} \cdot (\mu\text{M trolox} \cdot \text{dia})^{-1}$, evidenciando, assim como no método ABTS, que a atividade antioxidante dos *chips* de manga não sofreu grandes modificações com os diferentes tipos de embalagens em estudo. Deve-se lembrar, no entanto, que é possível que os carotenoides não tenham sido contabilizados pelo método DPPH.

Figura 5.10 – Modelo cinético de segunda ordem da alteração da atividade antioxidante pelo método DPPH (μM de trolox $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de *chips* de manga) das amostras armazenadas nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 Conclusões

Filmes à base de biopolímeros apresentaram maiores valores de permeabilidade ao vapor de água comparados aos filmes de PEAD, no entanto, a permeabilidade ao oxigênio chegou a ser três vezes menor e a opacidade quase sete vezes maior em relação à embalagem de PEAD, sendo possível afirmar que os filmes biodegradáveis analisados apresentaram uma barreira mais eficiente ao oxigênio e à luz quando comparados aos filmes de PEAD.

Os *chips* de manga armazenados na embalagem de PEAD foram os que menos sofreram alterações de cor, no entanto, foram os que tiveram menores conteúdos de β -caroteno em comparação com amostras das embalagens biodegradáveis, apresentando uma perda mais rápida desses compostos durante período analisado (100 dias), o que ressalta a importância dos efeitos do oxigênio e da luz na degradação dessa substância. É possível que interações entre as embalagens biodegradáveis e as amostras tenham ocorrido, alterando a cor de sua superfície sem modificar a qualidade nutricional.

A adição de ALG melhorou as propriedades de permeabilidade ao oxigênio e opacidade dos filmes de SPI e atuou na manutenção da qualidade dos *chips* de manga durante o

armazenamento, notado principalmente pelo maior conteúdo de β -caroteno das amostras envasadas no filme SPI-ALG. A adição de EB, no entanto, não alterou as permeabilidades ao oxigênio em relação aos filmes sem extrato, mas aumentou a opacidade do SPI-ALG. Porém, não foram encontradas vantagens na manutenção da qualidade dos *chips* de manga armazenados na embalagem SPI-ALG com extrato de beldroega.

Os filmes biodegradáveis demonstraram bom desempenho na preservação de manga desidratada, sobretudo pela barreira ao oxigênio, sugerindo que os materiais estudados, principalmente a combinação de SPI e ALG, possuem potencial para serem utilizados como embalagens. Eles poderiam ser empregados como uma alternativa ecológica para substituição parcial de plásticos à base de petróleo, prolongando a vida útil de frutas desidratadas. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários, assim como avaliação da segurança microbiológica do alimento desidratado.

REFERÊNCIAS

- AMADO, L. R.; SILVA, K. S.; MAURO, M. A. Drying of mangoes (*Mangifera indica* L. cv. Palmer) at changeable temperature conditions – Effects on energy consumption and quality of the dehydrated fruit. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 2, p. 1-13, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13615>.
- A.O.A.C. In Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists; W. Horwitz, Ed.; A.O.A.C: Arlington, **1995**; Chapter 33.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM E96-95: **Standard test methods of water vapor transmission of materials**. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1995.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM F 1927-14: **Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using a coulometric detector**. Philadelphia, 2014.
- BAGHERI, F.; RADI, M.; AMIRI, S. Drying conditions highly influence the characteristics of glycerol-plasticized alginate films. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 162–171, 2019.
- BANDYOPADHYAY, S.; SAHA, N.; BRODNJAK, U. V.; SÁHA, P. Bacterial cellulose and guar gum based modified PVP-CMC hydrogel films: Characterized for packaging fresh berries. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100402, 2019.
- BARBOSA-PEREIRA, L.; CRUZ, J. M.; SENDÓN, R.; QUIRÓS, A. R. B.; ARES, A.; CASTRO-LÓPEZ, M.; ABAD, M. J.; MAROTO, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. **Food Control**, v. 31, p. 236-243, 2013.

- BERMÚDEZ-ORIA, A.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G.; RUBIO-SENENT, F.; FERNÁNDEZ-PRIOR, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 148, p. 213–218, 2019.
- BRANDELERO, R., P. H.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. The effect of surfactant Tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1102–1109, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CAI, L.; WANG, Y.; CAO, A. The physiochemical and preservation properties of fish sarcoplasmic protein/chitosan composite films containing ginger essential oil emulsions. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 10, p. e13495, 2020.
- CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017.
- CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. **Food Hydrocolloids**, v. 38, 193-204, 2014.
- CIANNAMEA, E. M.; STEFANI, P. M.; RUSECKAITE, R. A. Properties and antioxidante activity of soy protein concentrate films incorporated with red grape extract processed by casting and compression molding. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 353-362, 2016.
- DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J.; VOILLEY, A. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 4, p. 299–313, 1998.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; CATALÁ, R.; GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, p. 42-51, 2014.
- GONTARD, N.; THIBAUT, R.; CUQ, B.; GUILBERT, S. Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1064-1069, 1996.
- HAN, J.; RUIZ-GARCIA, L.; QIAN, J., YANG, X. Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, 2018.
- HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Preparation and characterization of antioxidante soy protein isolate films incorporating licorice residue extract. **Food Hydrocolloids**, v. 75, p. 13-21, 2018.
- KAEWKLIN, P.; SIRIPATRAWAN, U.; SUWANAGUL, A.; LEE, Y. S. Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 523–529, 2018.

- KANIKIREDDY, V.; VARAPRASAD, K.; RANI, M. S.; VENKATASWAMY, P.; REDDY, B. J. M.; VITHAL, M. Biosynthesis of CMC-Guar gum-Ag⁰ nanocomposites for inactivation of food pathogenic microbes and its effect on the shelf life of strawberries. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116053, 2020.
- KOSHY, R. R.; MARY, S. K.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A. Environment friendly green composites based on soy protein isolate – A review. **Food Hydrocolloids**, 50, 174 – 192, 2015.
- KUMAR, A.; SREEDHARAN, S.; KASHYAP, A. K.; SINGH, P.; RAMCHIARY, N. A review on bioactive phytochemicals and ethnopharmacological potential of purslane (*Portulaca oleracea* L.). **Heliyon**, v. 8, e08669, 2022.
- LABUZA, T. P. The properties of water in relationship to water binding in foods: A review. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 1, p. 167–190, 1977.
- LI, Y.; LAI, C.; SU, M.; CHENG, J.; CHANG, Y. Antiviral activity of *Portulaca oleracea* L. against influenza A viroses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 241, p. 112013, 2019.
- LIU, Y.; ZHAO, L.; XIE, Y.; CHEN, Z.; YANG, S.; YIN, B.; LI, G.; GUO, H.; LIN, S.; WU, J. Antiviral activity of *portulaca oleracea* L. extracts against porcine epidemic diarrhea virus by partial suppression on myd88/NF- κ b activation in vitro. **Microbial Pathogenesis**, v. 154, p. 104832, 2021.
- LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1376–1384, 2012.
- LU, J.; LI, T.; MA, L.; LI, S.; JIANG, W.; QIN, W.; LI, S.; LI, Q.; ZHANG, Z.; WU, H. Optimization of heat-sealing properties for antimicrobial soybean protein isolate film incorporating diatomite/thymol complex and its application on blueberry packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 29, p. 100690, 2021.
- MARYAM ADILAH, Z. A.; JAMILAH, B.; NUR HANANI, Z. A. Functional and antioxidant properties of protein-based films incorporated with mango kernel extract for active packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 207-218, 2018.
- MA, Y.; BAO, Y.; ZHANG, W.; YING, X.; STIEN, D. Four lignans from *Portulaca oleracea* L. and its antioxidant activities. **Natural Product Research**, v. 34, n. 16, p. 2276-2282, 2020.
- MIAO, L.; TAO, H.; PENG, Y.; WANG, S.; ZHONG, Z.; EL-SEEDI, H.; DRAGAN, S.; ZENGIN, G.; CHEANG, W. S.; WANG, Y.; XIAO, J. The anti-inflammatory potential of *Portulaca oleracea* L. (purslane) extract by partial suppression on NF- κ B and MAPK activation. **Food Chemistry**, v. 290, p. 239–245, 2019.
- MIGLIORANZA, B. M. G.; SPINELLI, F. R.; STOFFEL, F.; PIEMOLINI-BARRETO, L. T. Biodegradable film for raisins packaging application: Evaluation of physico-chemical characteristics and antioxidant potential. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130538, 2021.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, p. 139–148, 2011.

NILSUWAN, K.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T.; DE LA CABA, K. Fish gelatin monolayer and bilayer films incorporated with epigallocatechin gallate: Properties and their use as pouches for storage of chicken skin oil. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 783–791, 2019.

PALAFOX-CARLOS, H.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS–ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. **Food Chemistry**, v. 135, p. 105–111, 2012.

PALAFOX-CARLOS, H.; YAHIA, E. M.; ISLAS-OSUNA, M. A.; GUTIERREZ-MARTINEZ, P.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 7–13, 2012.

PARREIDT, T. S., MÜLLER, K., SCHMID, M. Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. **Foods**, v. 7, p. 170, 2018.

RANGARAJ, V. M.; RAMBABU, K.; BANAT, F.; MITTAL, V. Natural antioxidants-based edible active food packaging: An overview of current advancements. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101251, 2021.

RANI, P.; YU, X.; LIU, H.; LI, K.; HE, Y.; TIAN, H.; KUMAR, R. Material, antibacterial and anticancer properties of natural polyphenols incorporated soy protein isolate: A review. **European Polymer Journal**, v. 152, p. 110494, 2021.

RATTAYA, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 151–157, 2009.

RHIM, J-W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v.37, p. 323–330, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenóides: Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides em Alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 100p, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. Screening method for sweetpotato and cassava. In: *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*, International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington, D. C., 58 p., 2004.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre *ABTS*⁺. **Comunicado Técnico 128**. Embrapa Frutos Tropicais, Fortaleza Ceará, Julho, 2007b.

SAHRAEE, S.; MILANI, J. M.; REGENSTEIN, J. M.; KAFIL, H. S. Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review. **Food Bioscience**, v. 32, p. 100451, 2019.

SALGADO, N.; GIRALDO, G. I.; ORREGO, C. E. Influence of the extrusion operating conditions on the antioxidant, hardness and color properties of extruded mango. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 209-218, 2017.

SHELDON, R. A.; NORTON, M. Green chemistry and the plastic pollution challenge: towards a circular economy. **Green Chemistry**, v. 22, p. 6310-6322, 2020.

SILVA, I. D. L.; MORAES FILHO, L. E. P. T. M.; CAETANO, V. F.; ANDRADE, M. F.; HALLWASS, F.; BRITO, A. M. S. S.; VINHAS, G. M. Development of antioxidante active PVA films with plant extract of *Caesalpinia ferrea Martius*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 144, p. 111215, 2021.

SILVA, K. S.; MAURO, M. A.; GONÇALVES, M. P.; ROCHA, C. M. R. Synergistic interactions of locust bean gum with whey proteins: Effect on physicochemical and microstructural properties of whey protein-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 179-188, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.028>.

SONI, R.; HSU, Y.; ASOH, T.; UYAMA, H. Synergistic effect of hemiacetal crosslinking and crystallinity on wet strength of cellulose nanofiber-reinforced starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106956, 2021.

SOUZA, K. C.; CORREA, L. G.; SILVA, T. B. V. MOREIRA, T. F. M.; OLIVEIRA, A.; SAKANAKA, L. S.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; VALDERRAMA, P.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Soy Protein Isolate Films Incorporated with Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) Extract for Potential Use as Edible Oil Active Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, p. 998–1008, 2020.

UDDIN, M. K.; JURAIMI, A. S.; HOSSAIN, M. S.; NAHAR, M. A. U.; ALI, M. E.; RAHMAN, M. M. Purslane Weed (*Portulaca oleracea*): A Prospective Plant Source of Nutrition, Omega-3 Fatty Acid, and Antioxidant Attributes. **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2014.

VIDAL, O. L.; SANTOS, C. B.; BATISTA, A. P.; ANDRIGO, F. F.; BARÉA, B.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; GONTARD, N.; VILLENEUVE, P.; GUILLARD, V.; REZENDE, C. M.; BOURLIEU-LACANAL, C.; FERREIRA, M. S. L. Active packaging films containing antioxidant extracts from green coffee oil by-products to prevent lipid oxidation. **Journal of Food Engineering**, v. 312, p. 110744, 2022.

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

YAN, Y.; DUAN, S.; ZHANG, H.; LIU, Y.; LI, C.; HU, B.; LIU, A.; WU, D.; HE, J.; WU, W. Preparation and characterization of Konjac glucomannan and pullulan composite films for strawberry preservation. **Carbohydrate Polymers**, v. 243, p. 116446, 2020

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo evidenciou a importância das condições de pH e da composição das soluções filmogênicas sobre as propriedades de filmes e demonstrou as vantagens das composições de proteína e polissacarídeo sobre os filmes somente de proteína.

As interações e propriedades das misturas SPI-ALG, verificadas pelo potencial zeta, ensaios reológicos, FTIR e microscopia confocal indicaram alterações na estrutura do gel com a variação do pH e das concentrações de polissacarídeo. Misturas com 0,75% ALG nos pHs 6 e 8 foram as que apresentaram maior força do gel. Apesar disso, os filmes biodegradáveis com maior resistência mecânica foram obtidos no pH 11. Tal fato pode estar relacionado a modificações conformacionais que teriam ocorrido durante a secagem das soluções filmogênicas ou ainda à presença de glicerol nos filmes.

A respeito dos filmes, conclui-se que adição crescente de ALG nos filmes de SPI aumentou a opacidade, solubilidade e melhorou as propriedades mecânicas, com particularidades específicas para cada pH. No pH 11 a adição de ALG reduziu significativamente a permeabilidade ao oxigênio dos filmes, atingindo uma redução de 132% com a concentração de 1% ALG.

A adição de extrato de beldroega nos filmes simples (SPI) e compostos (SPI-ALG) não alterou a estrutura dos filmes, analisada pelo FTIR, mas reduziu a cristalinidade relativa e aumentou a opacidade e a atividade antioxidante. Além disso, nos filmes compostos, aumentou a tensão.

Filme comercial de PEAD apresentou menor permeabilidade ao vapor da água em relação aos filmes biodegradáveis, porém menor opacidade e maior permeabilidade ao oxigênio. A permeabilidade ao oxigênio dos filmes com EB não foi alterada em comparação aos filmes sem extrato.

Em relação ao estudo de armazenamento, as embalagens de filmes biodegradáveis demonstraram bom desempenho na preservação de *chips* de manga, sobretudo a combinação de SPI-ALG, que apresentou a menor taxa de degradação de β -caroteno. Apesar da necessidade de estudos mais aprofundados e avaliação da segurança microbiológica do alimento, os biofilmes à base SPI-ALG demonstraram grande potencial como embalagem biodegradável de alimentos desidratados.

Um amplo conjunto de dados obtidos neste estudo demonstra as vantagens e limitações das diferentes composições e pHs utilizados na elaboração dos filmes, que servirão para nortear futuras investigações.

PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento de filmes biodegradáveis substitutos de filmes plásticos derivados do petróleo ganha cada vez mais importância na agenda da sustentabilidade ambiental, mas requer ainda muitos estudos. As misturas de proteínas e polissacarídeos têm demonstrado melhorias significativas em propriedades de filmes, em comparação com filmes simples, como constatado na presente pesquisa. Entretanto, ainda são necessárias mais investigações. Diante disso, considera-se avaliar a influência de outros polissacarídeos na formação e nas características de filmes à base de proteína isolada de soja, bem como filmes formados com outras concentrações de SPI.

Em relação às aplicações em embalagens de frutas desidratadas, a presente pesquisa é preliminar. Um dos aspectos importantes a ser investigado é a segurança microbiológica da manga desidratada armazenada nas embalagens biodegradáveis e no polietileno de alta densidade.

Ainda na linha de aplicação, é relevante avaliar, quanto ao aspecto sensorial, o comportamento do consumidor em relação aos filmes de SPI e SPI-ALG, ambos sem e com extrato de beldroega, utilizados como embalagens para *chips* de manga.

Questões como o tempo de degradação das embalagens comestíveis e o comportamento dos filmes biodegradáveis na forma de embalagens em diferentes condições ambiente também devem ser investigadas.

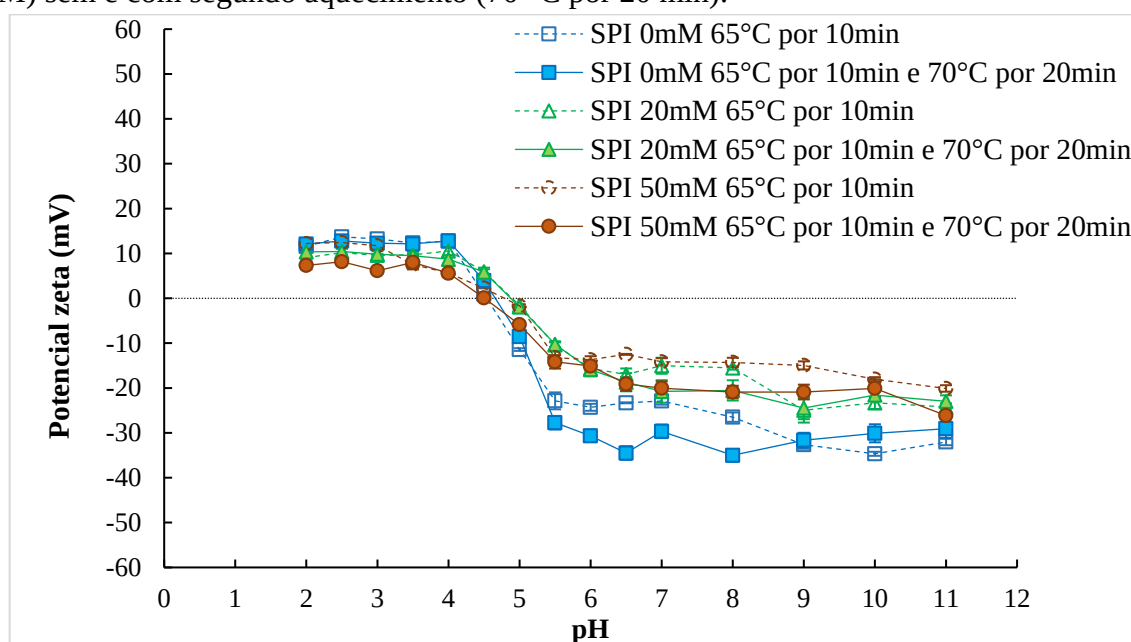
Por fim, os filmes estudados demonstraram boa afinidade com o extrato de beldroega e tiveram sua atividade antioxidante aumentada. Um aprofundamento nessa investigação seria a avaliação da atividade antioxidante das embalagens biodegradáveis durante tempo de armazenamento.

APÊNDICE A: Influência do pH, força iônica e segundo aquecimento na carga líquida das soluções de SPI, ALG e misturas sobre o potencial zeta.

Na Figura A1 está apresentada a varredura do potencial zeta de soluções de SPI em diferentes concentrações de sal (0, 20 e 50 mM) e aquecimentos, sendo que, como descrito na metodologia (Item 2.2.2), a SPI passou por um primeiro aquecimento com o objetivo de ajudar na solubilização da solução estoque, e por um segundo aquecimento, realizado no final do processo de elaboração do filme, para permitir uma melhor interação entre os polímeros, quando adicionado o alginato. No entanto, a fim de comparação, esse segundo aquecimento foi também realizado para filmes formados somente de SPI.

Pelo gráfico (Figura A1) é possível notar que, de modo geral, o segundo aquecimento permitiu que mais cargas fossem expostas, uma vez que, para as três concentrações de sal, as soluções com ambos os aquecimentos apresentaram uma maior quantidade de cargas negativas. No entanto, verifica-se que as maiores diferenças de cargas, sem e com o segundo aquecimento, ocorre na região entre pHs 6 e 9. Possivelmente, no restante dos pHs o aquecimento proporciona menor influência do que condições advindas do pH podem oferecer. Observou-se também que a concentração salina de 20 mM foi a que menos sofreu influência do segundo aquecimento, na qual diferenças perceptíveis ocorreram apenas nos pHs 7 e 8.

Figura A.1 – Potencial zeta de soluções aquosas de SPI a diferentes forças iônicas (0, 20 e 50 mM) sem e com segundo aquecimento (70 °C por 20 min).



Fonte: Elaborado pelo autor

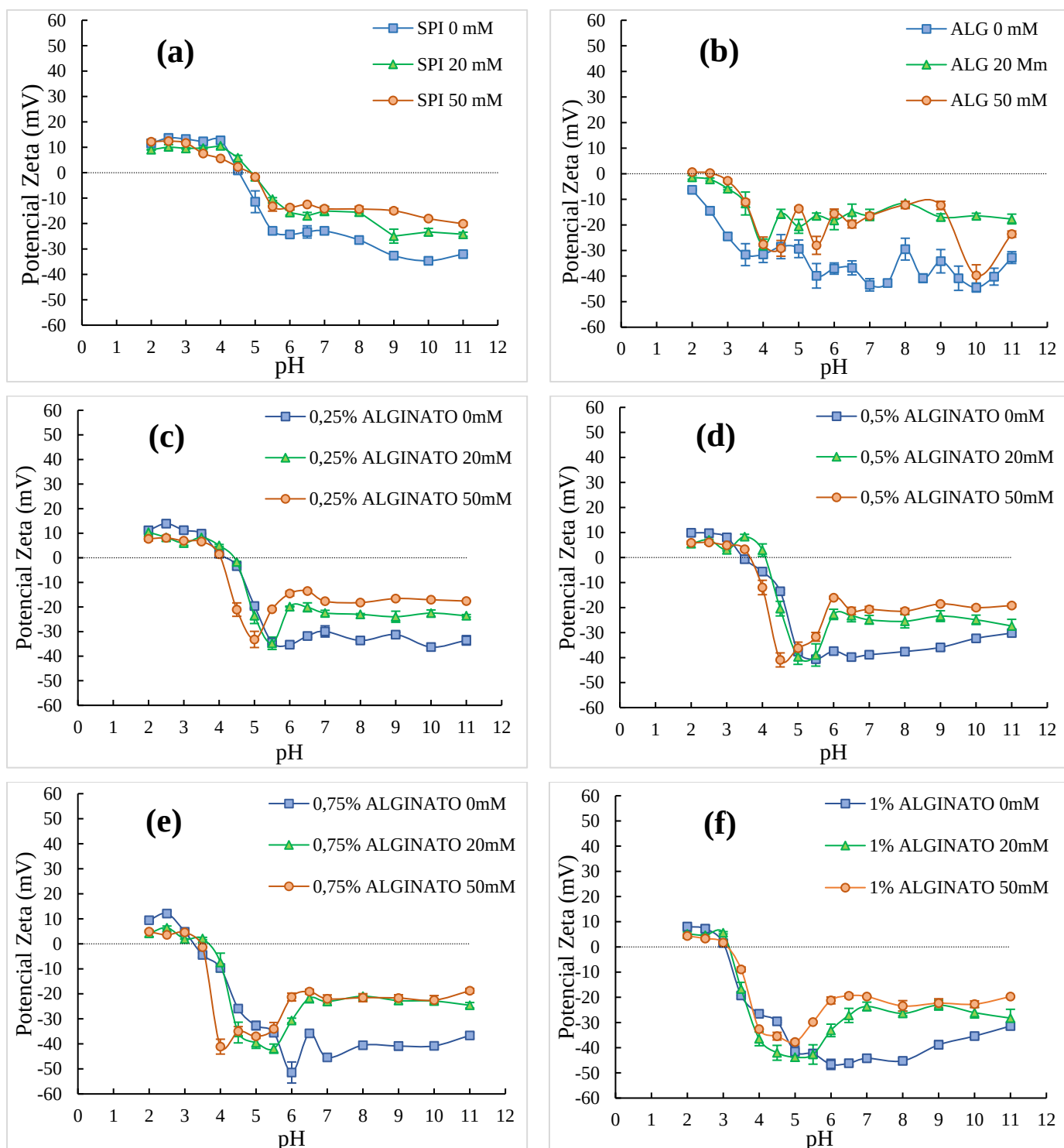
A varredura das soluções puras de SPI (5%) e alginato (1%), assim como as misturas de SPI (5%) com diferentes concentrações de ALG (0,25; 0,5; 0,75; 1%), sem correção da força iônica, 20 mM e 50mM, realizada em uma ampla faixa de pH (2 a 11), estão apresentadas na Figura 2A, sendo as Figuras A2a e A2b correspondentes as soluções puras de SPI e ALG, respectivamente, e as Figuras A2c a A2f com adição de ALG nas diferentes concentrações mencionadas. A diluição utilizada foi de 1:100, ressaltando que as diluições das soluções com ajuste da força iônica foram realizadas com soluções salinas na mesma força iônica desejada.

Sabe-se que os fatores que mais afetam o potencial zeta são o pH e a força iônica do meio no qual as partículas estão dispersas. Na Figura A2 é possível verificar essas influências. A varredura da solução estoque de SPI, que foi solubilizada no pH 11 e aquecida a 65 °C por 10min, como já observado no item 2.3.1, demonstra que o pH correspondente a reversão de cargas da proteína alterou-se com a adição de sal. Na Figura A2a é possível notar que esse pH se estabeleceu próximo ao pH 4,5 para a solução sem correção da força iônica e próximo ao pH 5 para as soluções com acréscimo de sal, 20 mM e 50 mM.

Com respeito ao alginato, este apresenta cargas negativas em toda faixa de pH analisada, como esperado, uma vez que o alginato é considerado um polissacarídeo aniônico, e o valor de pKa se estabeleceu próximo a 2,0. As concentrações de 20 e 50 mM proporcionam intensidade de cargas semelhantes para o alginato entre os pHs 2 e 4, e nos pHs 7 e 8, porém no restante na faixa há uma variação significativa, e não se verifica uma tendência.

Em relação à força iônica, de modo geral, notou-se que a adição de sal reduziu o valor do potencial zeta das soluções puras e misturas, sendo que para alguns pHs, essa mudança foi mais pronunciada. Nota-se que em pHs na faixa de 6 a 10 a diferença no valor das cargas, em relação as diferentes forças iônicas, é mais perceptível. Essa diferença também pode ser observada entre as soluções puras e as diferentes misturas. Comparando-se a varredura da SPI 0 mM com 20 e 50 mM (Figura A2a), nota-se que a diferença entre as cargas é menor que a encontrada para as misturas com ALG (Figuras A2c a A2f).

Figura A.2 – Potencial zeta de soluções aquosas de SPI (a), alginato (b) e misturas de SPI (5%) com diferentes concentrações de alginato (c a f: 0,25; 0,5; 0,75 e 1%) em diferentes pH's (2 a 11) e diferentes forças iônicas (0, 20 e 50 mM).



Fonte: Elaborado pelo autor

APÊNDICE B: Efeito da força iônica sobre os ensaios oscilatórios de soluções de SPI (5%) com adição de alginato (1%).

Soluções de SPI (5%) com acréscimo de ALG (1%), corrigidas para pH 11, e com diferentes concentrações salinas (0, 20 e 50 mM), foram analisadas por meio de ensaios oscilatórios.

Na Figura B1 está apresentada a dependência do G' com a deformação (faixa de 0,001 a 1), frequência de $5 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, utilizada para determinar a região de viscoelasticidade linear (RVL), na qual a estrutura do material é preservada. Nota-se que a RVL das três soluções ficou bem próxima, assim como a deformação crítica, que representa o limite da região de viscoelasticidade linear. De acordo com os resultados, foi escolhida a deformação de 2% para determinação dos espectros mecânicos, apresentados na Figura B1.

Na Figura B1 nota-se que os módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'') apresentam praticamente o mesmo comportamento para as soluções sem adição de NaCl e nas duas concentrações salinas (20 e 50 mM). Para menores frequências, G' é maior que G'' nas soluções 0 e 50 mM, o que pode indicar um material mais estruturado.

A dependência de G' e G'' com a frequência foi descrita por uma equação da lei da potência, e os parâmetros do modelo para as amostras de SPI-ALG nas diferentes concentrações de sal estão apresentados na Tabela B1.

Pela Tabela B1 pode-se verificar que o modelo da Lei da Potência exibe altos coeficientes de determinação ($R^2 > 0,998$) e, portanto, pode ser utilizado para representar o comportamento de G' e G'' com a frequência, no caso das soluções SPI (5%) - ALG (1%) no pH 11. Nota-se que os valores de n' e n'' não apresentaram diferença significativa com a variação da força iônica, podendo indicar que não houve consideráveis alterações na estrutura do gel. Para os ensaios definitivos foi definida força iônica de 20 mM.

Figura B1 – Soluções de SPI (5%) e ALG (1%) pH 11 a diferentes concentrações de sal (0, 20 e 50 mM), (a) deformação versus G' a $5 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$; (b) G' e G'' versus frequência, na deformação 0,02.

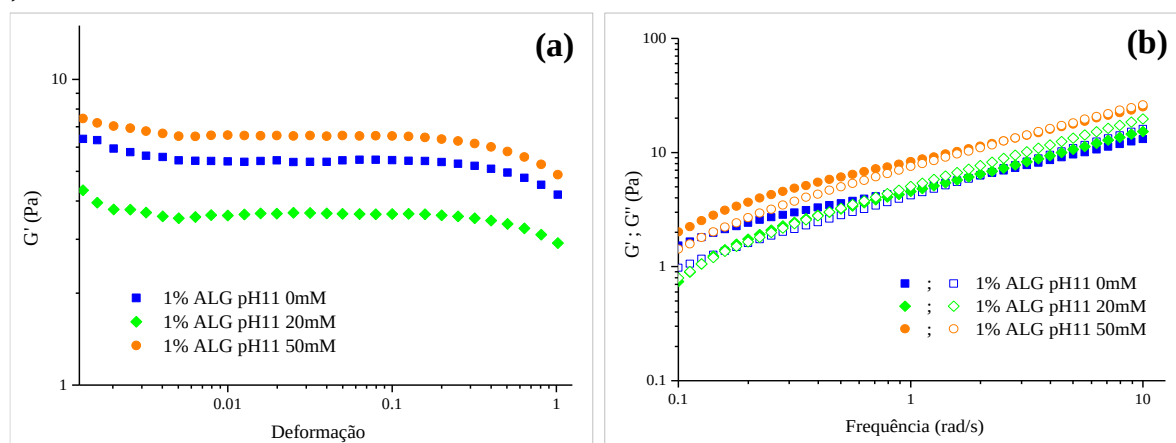


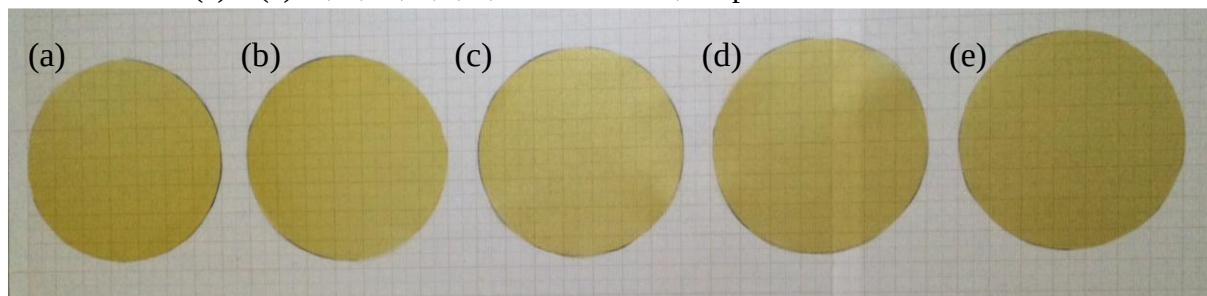
Tabela B1 – Parâmetros da Lei da Potência para soluções SPI-ALG em diferentes forças iônicas.

Formulação	$A' \text{ (Pa}\cdot\text{s}^n)$	n'	R^2	$A' \text{ (Pa}\cdot\text{s}^n)$	n'	R^2
SPI-1%ALG 0mM	$4,72 \pm 0,29^b$	$0,44 \pm 0,08^a$	0,998	$4,21 \pm 0,37^a$	$0,59 \pm 0,02^a$	0,999
SPI-1%ALG 20mM	$4,45 \pm 0,40^b$	$0,54 \pm 0,04^a$	0,998	$4,98 \pm 0,73^a$	$0,61 \pm 0,00^a$	0,999
SPI-1%ALG 50mM	$8,18 \pm 1,21^a$	$0,48 \pm 0,01^a$	0,999	$7,37 \pm 1,23^a$	$0,56 \pm 0,00^a$	0,999

*Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão); **Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

APÊNDICE C: Imagens dos filmes biodegradáveis de SPI e SPI-ALG

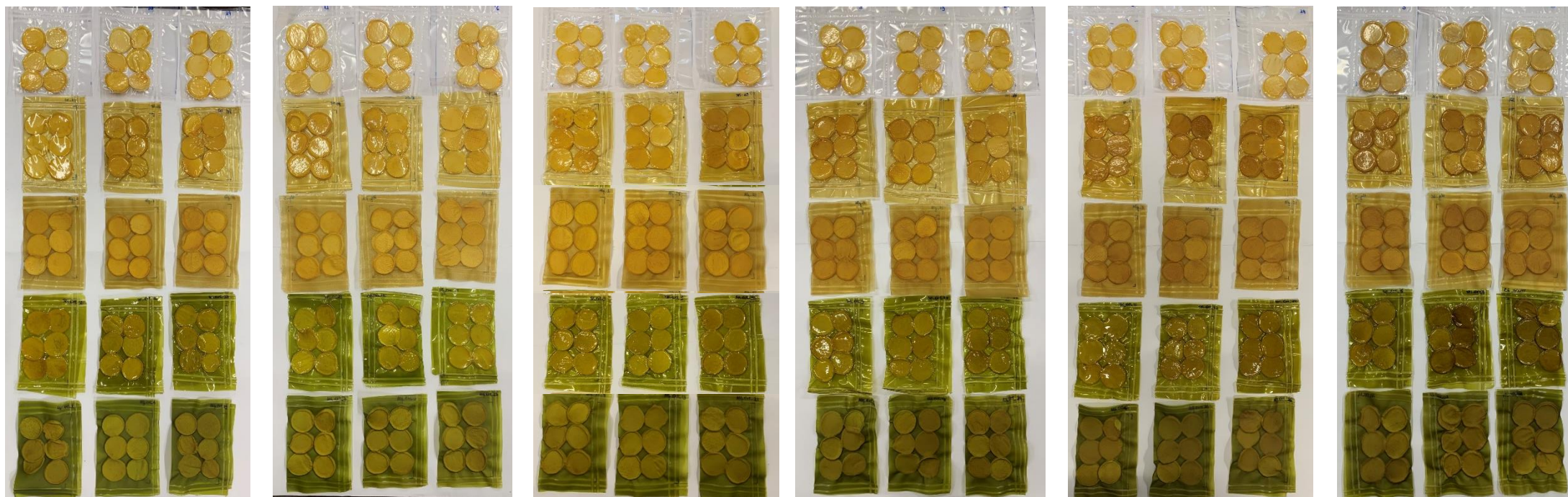
Figura C1 – Filmes biodegradáveis elaborados a partir de SPI e filmes compostos de SPI com acréscimo de: (a) a (e): 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1% ALG, no pH 11.



Fonte: Elaborado pelo autor

APÊNDICE D. Embalagens das diferentes formulações retiradas em cada dia de análise

Figura D1 – Fotos das embalagens retiradas em cada dia de análise, com as formulações na seguinte ordem: PEAD, SPI, SPI-ALG, SPI-EB e SPI-ALG-EB

5° Dia**10° Dia****20° Dia****40° Dia****70° Dia****100° Dia**

Fonte: Elaborado pelo autor

APÊNDICE E. Solução extratora mais eficaz para atividade antioxidante de *chips* de manga

Para este teste, as mangas apresentaram °Brix de $16,37 \pm 0,47$ e foram cortadas em espessura média de $5,11 \pm 0,21$ mm de diâmetro. Após sua secagem, a umidade foi de $7,28 \pm 0,13\%$ e a atividade de água, $0,4466 \pm 0,0049$. Três soluções aquosas foram testadas para seleção do melhor método de extração dos compostos antioxidantes em *chips* de manga (Tabela E1).

A solução mais eficiente para extração, pelos dois métodos analisados (ABTS e DPPH), foi o metanol 80%, que apresentou média estatisticamente maior ($p < 0,05$) que as demais soluções extratoras.

Tabela E.1 – Atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH de *chips* de manga com diferentes soluções extratoras.

Soluções extratoras	ABTS (μM trolox/100g)	DPPH (μM trolox/100g)
Acetona 80%	$1342,60 \pm 86,21^b$	$953,78 \pm 122,41^b$
Etanol 80%	$1491,58 \pm 89,35^b$	$823,40 \pm 72,74^c$
Metanol 80%	$2068,97 \pm 136,48^a$	$1108,63 \pm 88,19^a$

Resultados expressos em (média $\pm$ desvio padrão)

a,b,c Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

APÊNDICE F. Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE) (Tabela F1), conteúdo de β -caroteno (mg/g amostra seca) (Tabela F2) e atividade antioxidantes pelos métodos ABTS e DPPH (Tabela F3) nos *chips* de manga durante os 100 dias de armazenamento.

Tabela F.1 – Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h e ΔE) dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante estocagem à 25 °C.

Embalagem	Parâmetros de cor	Tempo de armazenamento (dias)						
		0 dias	5 dias	10 dias	20 dias	40 dias	70 dias	100 dias
SPI	L^*	72,91 ± 1,36	72,00 ± 1,43	73,56 ± 1,70	70,98 ± 2,16	67,78 ± 1,40	65,56 ± 3,10	67,44 ± 1,78
	a^*	12,52 ± 1,57	13,11 ± 1,36	12,32 ± 2,16	13,17 ± 1,03	14,61 ± 1,62	13,54 ± 2,05	11,87 ± 0,96
	b^*	56,25 ± 3,30	56,14 ± 1,86	55,24 ± 3,31	54,23 ± 2,68	52,56 ± 3,95	46,11 ± 1,95	42,01 ± 1,96
	C^*	57,64 ± 3,49	57,66 ± 1,98	56,61 ± 3,67	55,82 ± 2,64	54,55 ± 4,21	48,08 ± 2,39	43,66 ± 2,10
	h	77,48 ± 1,12	76,87 ± 1,18	77,51 ± 1,48	76,33 ± 1,17	74,50 ± 0,73	73,71 ± 1,83	74,24 ± 0,76
	ΔE	-	1,08	1,22	2,87	6,66	12,57	15,27
SPI-EB	L^*	72,91 ± 1,36	71,48 ± 1,43	73,72 ± 2,12	70,61 ± 2,12	68,53 ± 1,97	66,72 ± 2,30	65,98 ± 2,61
	a^*	12,52 ± 1,57	14,46 ± 2,00	12,23 ± 1,74	13,41 ± 1,50	14,15 ± 1,70	13,17 ± 0,79	12,54 ± 1,19
	b^*	56,25 ± 3,30	57,79 ± 4,27	53,33 ± 3,29	54,09 ± 2,40	50,88 ± 2,34	48,03 ± 2,20	43,15 ± 3,49
	C^*	57,64 ± 3,49	59,58 ± 4,60	54,73 ± 3,54	55,74 ± 2,66	52,69 ± 2,63	49,81 ± 2,25	44,93 ± 3,63
	h	77,48 ± 1,12	76,01 ± 1,02	77,13 ± 1,21	76,11 ± 1,00	74,56 ± 1,26	74,66 ± 0,74	73,80 ± 0,81
	ΔE	-	2,86	3,04	3,28	7,12	10,31	14,83
SPI-ALG	L^*	72,91 ± 1,36	72,55 ± 0,96	71,90 ± 2,52	72,72 ± 0,94	67,49 ± 1,79	66,39 ± 0,97	63,91 ± 2,68
	a^*	12,52 ± 1,57	14,01 ± 1,11	13,96 ± 2,03	12,95 ± 1,30	15,61 ± 2,03	14,40 ± 1,39	14,27 ± 1,27
	b^*	56,25 ± 3,30	56,49 ± 1,30	56,46 ± 3,59	54,99 ± 2,68	52,99 ± 3,75	49,45 ± 3,59	48,03 ± 2,27
	C^*	57,64 ± 3,49	58,21 ± 1,44	58,17 ± 3,91	56,50 ± 2,81	55,26 ± 4,03	51,51 ± 3,78	50,11 ± 2,38
	h	77,48 ± 1,12	76,08 ± 0,92	76,18 ± 1,30	76,76 ± 0,98	73,62 ± 1,45	73,78 ± 0,81	73,46 ± 1,21
	ΔE	-	1,55	1,77	1,35	7,04	9,61	12,32

(continua)

Tabela F.1 – (continuação)

Embalagem	Parâmetros de cor	Tempo de armazenamento (dias)						
		0 dias	5 dias	10 dias	20 dias	40 dias	70 dias	100 dias
SPI-ALG-EB	L*	72,91 ± 1,36	72,20 ± 1,47	72,11 ± 1,61	70,31 ± 1,87	67,50 ± 1,38	67,43 ± 1,72	65,26 ± 1,62
	a*	12,52 ± 1,57	13,91 ± 1,81	13,51 ± 1,57	14,86 ± 2,09	15,03 ± 1,01	12,66 ± 1,32	13,15 ± 0,76
	b*	56,25 ± 3,30	54,43 ± 3,44	54,70 ± 3,09	55,13 ± 3,26	51,93 ± 1,35	44,71 ± 3,55	44,98 ± 1,52
	C*	57,64 ± 3,49	56,19 ± 3,73	56,35 ± 3,36	57,11 ± 3,63	54,07 ± 1,48	46,48 ± 3,68	46,86 ± 1,56
	h	77,48 ± 1,12	75,71 ± 1,13	76,17 ± 0,85	74,97 ± 1,34	73,87 ± 0,86	74,18 ± 1,13	73,70 ± 0,82
	ΔE	-	2,40	2,00	3,68	7,36	12,77	13,64
PEAD	L*	72,91 ± 1,36	73,58 ± 1,91	72,78 ± 1,07	73,17 ± 1,59	72,05 ± 1,03	71,12 ± 1,15	70,78 ± 2,03
	a*	12,52 ± 1,57	12,43 ± 1,44	13,66 ± 0,99	12,26 ± 0,87	13,82 ± 1,32	13,04 ± 1,00	12,40 ± 1,62
	b*	56,25 ± 3,30	54,52 ± 2,69	57,41 ± 1,65	55,18 ± 2,94	55,46 ± 2,86	50,97 ± 1,63	48,07 ± 3,87
	C*	57,64 ± 3,49	55,93 ± 2,87	59,02 ± 1,58	56,53 ± 2,96	57,17 ± 3,05	52,61 ± 1,78	49,65 ± 4,11
	h	77,48 ± 1,12	77,19 ± 1,07	76,61 ± 1,07	77,46 ± 0,85	76,03 ± 0,77	75,67 ± 0,74	75,58 ± 0,95
	ΔE	-	1,86	1,63	1,13	1,75	5,60	8,46

Tabela F.2 – Conteúdo de β -caroteno ($\mu\text{g/g}$ amostra) dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante estocagem à 25 °C.

Tempo (dias)	β-caroteno ($\mu\text{g/g}$ amostra)				
	SPI	SPI-EB	SPI-ALG	SPI-ALG-EB	PEAD
0	25,58 $\pm$ 1,40	25,58 $\pm$ 1,40	25,58 $\pm$ 1,40	25,58 $\pm$ 1,40	25,58 $\pm$ 1,40
5	23,18 $\pm$ 1,02	26,00 $\pm$ 3,02	26,88 $\pm$ 1,62	25,67 $\pm$ 6,17	22,07 $\pm$ 2,58
10	23,50 $\pm$ 0,91	20,89 $\pm$ 1,06	24,39 $\pm$ 1,63	27,12 $\pm$ 2,60	22,00 $\pm$ 2,23
20	20,61 $\pm$ 3,97	22,02 $\pm$ 0,66	24,80 $\pm$ 1,82	25,42 $\pm$ 1,68	20,91 $\pm$ 1,69
40	20,74 $\pm$ 2,85	20,41 $\pm$ 1,11	19,51 $\pm$ 2,16	22,06 $\pm$ 3,05	17,82 $\pm$ 2,65
70	17,18 $\pm$ 1,92	19,76 $\pm$ 1,55	20,17 $\pm$ 1,16	20,09 $\pm$ 1,25	15,64 $\pm$ 1,00
100	16,81 $\pm$ 1,38	17,06 $\pm$ 2,87	20,70 $\pm$ 2,70	17,26 $\pm$ 1,40	16,55 $\pm$ 1,94

Tabela F.3 – Atividade antioxidante (AA) pelos métodos ABTS e DPPH, em μM de Trolox/100g amostra, dos *chips* de manga armazenados nas diferentes embalagens biodegradáveis e no PEAD durante estocagem à 25 °C.

Tempo (dias)	AA pelo método ABTS (μM de Trolox/100g amostra)				
	SPI	SPI-EB	SPI-ALG	SPI-ALG-EB	PEAD
0	2012,60 $\pm$ 274,16	2012,60 $\pm$ 274,16	2012,60 $\pm$ 274,16	2012,60 $\pm$ 274,16	2012,60 $\pm$ 274,16
5	1994,12 $\pm$ 244,57	1999,09 $\pm$ 314,36	2110,76 $\pm$ 252,90	2136,18 $\pm$ 226,46	2204,60 $\pm$ 248,82
10	1958,82 $\pm$ 108,38	1707,43 $\pm$ 247,97	2048,17 $\pm$ 150,29	1912,48 $\pm$ 186,59	1729,00 $\pm$ 148,00
20	1941,24 $\pm$ 97,39	1888,89 $\pm$ 100,32	1678,15 $\pm$ 108,79	1846,89 $\pm$ 160,34	1812,31 $\pm$ 171,94
40	1649,20 $\pm$ 79,25	1556,63 $\pm$ 150,21	1567,25 $\pm$ 92,82	1306,38 $\pm$ 107,68	1897,13 $\pm$ 168,17
70	1691,27 $\pm$ 107,28	1629,69 $\pm$ 240,24	1769,51 $\pm$ 190,57	1764,43 $\pm$ 205,37	1717,70 $\pm$ 198,84
100	1635,04 $\pm$ 123,37	1953,44 $\pm$ 116,39	1887,34 $\pm$ 93,38	1752,61 $\pm$ 64,17	1720,32 $\pm$ 215,51
Tempo (dias)	AA pelo método DPPH (μM de Trolox/100g amostra)				
	SPI	SPI-EB	SPI-ALG	SPI-ALG-EB	PEAD
0	1468,25 $\pm$ 48,07	1468,25 $\pm$ 48,07	1468,25 $\pm$ 48,07	1468,25 $\pm$ 48,07	1468,25 $\pm$ 48,07
5	1444,10 $\pm$ 44,31	1516,04 $\pm$ 217,22	1568,90 $\pm$ 137,50	1510,11 $\pm$ 79,13	1589,19 $\pm$ 51,60
10	1472,17 $\pm$ 46,44	1478,81 $\pm$ 158,37	1662,41 $\pm$ 76,87	1566,45 $\pm$ 38,56	1421,39 $\pm$ 126,42
20	1401,67 $\pm$ 105,48	1391,25 $\pm$ 79,77	1262,21 $\pm$ 77,22	1277,31 $\pm$ 111,64	1359,13 $\pm$ 151,06
40	1383,98 $\pm$ 91,47	1499,50 $\pm$ 80,29	1374,98 $\pm$ 63,78	1372,05 $\pm$ 205,59	1594,05 $\pm$ 73,08
70	1169,47 $\pm$ 114,59	1205,26 $\pm$ 157,75	1282,72 $\pm$ 77,86	1260,02 $\pm$ 62,96	1329,01 $\pm$ 154,31
100	963,91 $\pm$ 78,99	1207,59 $\pm$ 54,91	1204,45 $\pm$ 91,44	1161,78 $\pm$ 103,64	1123,67 $\pm$ 63,15