



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
DE MINAS, METALÚRGICA E DE MATERIAIS
PPG3M



**ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES
BIODEGRADÁVEIS A BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Patrícia Cofferi

Porto Alegre, fevereiro de 2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E DE
MATERIAIS**

**ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS
A BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Patrícia Cofferi
Engenheira Química

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Engenharia.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Ruth Marlene Campomanes Santana

Porto Alegre, fevereiro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitor: Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann

Vice-reitora: Profª Drª Jane Fraga Tutikian

ESCOLA DE ENGENHARIA

Diretor: Prof. Dr. Luiz Carlos Pinto da Silva Filho

Vice-Diretora: Profª Drª Carla Schwengber ten Caten

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador: Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Vice-Coordenador: Prof. Dr. Afonso Reguly

Coffferri, Patrícia

Estratégias de modificação no desenvolvimento de filmes biodegradáveis a base de proteína isolada de soja / Patrícia Coffferri – 2020

111 f.

Orientadora Profª Drª Ruth Marlene Campomanes Santana

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. polímeros biodegradáveis. 2. hidrofobicidade 3. reticulação.
Santana, Ruth Marlene Campomanes, orient.

PATRÍCIA COFFERRI

**ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS
A BASE DE PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA**

Prof. Orientadora: Ruth Marlene Campomanes Santana

Aprovado em: __/__/__

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, área de concentração de Ciência e Tecnologia dos Materiais, e aprovada em sua forma final, pelo orientador e pela Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação.

Banca examinadora:

Prof. Edson Francisquetti- IFRS - Farroupilha

Profa. Carmen Iara Walter Calcagno – IFSUL – Sapucaia do Sul

Dra. Paula Cristina Dartora – ISI Polímeros

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, aos meus pais Carlos e Maria Loreni, por nunca terem medido esforços para me apoiar e incentivar meus estudos.

A Paola minha irmã e melhor amiga e ao meu amor Guilherme por todo apoio neste momento tão difícil e desgastante, por terem sido os melhores psicólogos.

A Professora Ruth por auxiliar no desenvolvimento deste trabalho sempre com muito entusiasmo e dedicação, sendo um exemplo de profissional que ama o que faz.

A todos os colegas que passaram neste período e os que ainda estão pela sala 117, por sempre estarem dispostos a trocar ideias sobre os projetos e sugerir novos caminhos. Em especial pelo apoio e trabalho em conjunto da minha colega e amiga Charon e aos bolsistas Bruna, Eduardo e Lud que muito auxiliaram neste trabalho.

Aos meus amigos (Bruna, Grace, Fernanda, Ethiane, Vanessa, Diego, Erick, Peter e Everton) por sempre me apoiarem e em especial a Bruna e a Grace pelo apoio e as conversas motivadoras sobre a pesquisa e a ciência.

Agradeço ao IFSul, a Fátima, Eliane e a Professora Carmen por sempre abrirem as portas do Instituto, auxiliando na realização dos ensaios mecânicos.

Ao Professor Edson Francisquetti pelo auxílio na realização das análises de FTIR.

Ao ISI Polímeros pela realização de MEV.

A empresa Bremil S. A. pelo fornecimento das amostras de PIS.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalurgia e de Materiais – PPGE3M, pela oportunidade de realização deste trabalho. E ao CNPq pela provisão da bolsa de mestrado.

Trabalhos Publicados

COFFERRI P., MORAES C. T., MONTICELLI B., GONÇALVES E. R., SANTANA R. M. C. Influência da adição de ácido tânico em filmes biodegradáveis de proteína de soja isolada. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, Bento Gonçalves- RS - Brasil, 2019.

COFFERRI P., MORAES C. T., MONTICELLI B., SANTANA R. M. C. Influência do teor de glicerol nas propriedades de filmes biodegradáveis de proteína de soja isolada. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, Bento Gonçalves- RS - Brasil, 2019.

COFFERRI P., MORAES C. T., MONTICELLI B., SANTANA R. M. C. Filmes biodegradáveis a base de proteína de soja: Efeito das condições de processamento. 7º Seminário de Inovação e Tecnologia (INOVTEC) do IFSul, Sapucaia do Sul-RS- Brasil, 2018.

Resumo

O impacto ambiental causado pela alta demanda de embalagens provenientes de polímeros sintéticos não biodegradáveis é um grave problema que tem demandado atenção de toda a comunidade científica. Desta forma, polímeros derivados de recursos naturais biodegradáveis tem atraído grande atenção nos últimos anos, sendo considerados potenciais substitutos aos polímeros usados atualmente. A proteína isolada de soja (PIS), subproduto da indústria de óleos vegetais, tem sido considerada uma forte candidata para a produção de embalagens biodegradáveis devido as suas boas propriedades de formação de filme e de barreira a gases. No entanto, suas propriedades de solubilidade e barreira à água ainda são insuficientes para sua aplicação comercial. Em vista disto, o estudo de soluções que possibilitem a redução da hidrofiliabilidade dos filmes produzidos com esta é necessário. Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento de filmes a base de PIS além da avaliação de duas estratégias de modificação da hidrofiliabilidade destes. Este estudo foi dividido em duas etapas, sendo a primeira uma etapa preliminar voltada à definição das condições de processamento por *casting* e do teor ideal do plastificante glicerol para a produção dos filmes e a segunda foi focada na adição de aditivos para modificação da hidrofiliabilidade dos filmes. Nos estudos preliminares foi demonstrado que a temperatura apresenta maior efeito sobre as propriedades dos filmes do que o tempo de mistura da solução, sendo que as condições ideais de produção dos filmes foram definidas como 75°C e 60 minutos de mistura em pH alcalino. Observou-se também nesta etapa que teor ideal de plastificante foi de 20% de glicerol no qual foi possível obter um bom efeito de plastificação sem elevar muito a hidrofiliabilidade do filme. A primeira estratégia de modificação da hidrofiliabilidade estudada na segunda etapa deste trabalho foi à avaliação da utilização de óleos vegetais, óleo de coco (OC) e de linhaça (OL), como agentes hidrofóbicos com teores de 1, 3 e 6%. Nesta etapa, pode-se verificar que ambos os óleos possibilitam a redução da absorção de umidade dos filmes e que estes apresentam fortes interações com a proteína, sendo estas mais pronunciadas para o OL, devido a forte presença de instaurações nas cadeias dos ácido graxos que o compõem. Definiu-se o teor de 3% como o teor ideal para adição de ambos os óleos. A segunda estratégia avaliou o uso de ácido tânico (AT) para reticular a cadeia da proteína e assim reduzir a interação desta com a água. Avaliaram-se os teores de 5, 10, 15 e 20% de AT. Foi observada a formação de pontos de reticulação com todos os teores de AT adicionados, sendo possível reduzir significativamente a solubilidade dos filmes e alterar suas propriedades mecânicas. O teor de 20% de AT foi definido como o ideal por reduzir a solubilidade dos filmes em cerca de 74%, mesmo que com este a flexibilidade dos filmes tenha sido reduzida. Por fim foi avaliada a interação dos óleos e o AT em seus teores ideais, sendo possível verificar um efeito sinérgico sobre as propriedades com a adição de AT e OL, onde se obteve uma redução significativa da solubilidade e da absorção de umidade dos filmes, além de uma elevação da resistência a tração sem prejudicar de forma significativa a alongação dos filmes. Por fim concluiu-se que a utilização em conjunto do OL e do AT possibilita a obtenção de filmes com propriedades interessantes para a aplicação em embalagens.

Abstract

The environmental impact caused by the high demand for packaging from synthetic non-biodegradable polymers is a serious problem that has demanded attention from the entire scientific community. Thus, polymers biodegradable derived from natural resources have drawn great attention in recent years, these have been considered potential substitutes for the currently used polymers. Soy protein isolated (SPI), co-product from the vegetable oil industry, has been considered a strong candidate for the production of biodegradable packaging due to its good film-forming and gas barrier properties. However, SPI's water solubility and water barrier properties are still insufficient for its commercial application. Because of this, the study of solutions to reduce the hydrophilicity of these films is necessary. This work aimed to develop films based on PIS in addition to the evaluation of two strategies for modifying their hydrophilicity. This was divided into two stages, the first being a preliminary stage to evaluate the conditions and the ideal content of the plasticizer glycerol for the production of the films, the second stage was focused on the addition of additives to modify the hydrophilicity of the films. In preliminary studies it was demonstrated that the temperature has a greater effect on the properties of the films than the mixing time of the solution, being that the ideal conditions of production of the films were defined as 75 ° C and 60 minutes of mixing in alkaline pH. It was also observed at this stage that the ideal plasticizer content was 20% of glycerol by weight of SPI because with this it was possible to have a good plasticization effect without increasing the hydrophilicity of the film. The first strategy studied in the second stage of this work was the evaluation of the use of vegetable oils, coconut oil (CO) and linseed oil (LO) as hydrophobic agents. The addition of 1, 3 and 6% of oils was evaluated. In this step, it can be verified that both oils allowed the reduction of moisture absorption of the films and that they present strong interactions with the protein chain, which were more pronounced for linseed oil, due to the strong presence of unsaturation in the fatty acid chains that compose it. The 3% content was defined as the ideal content for adding both oils. The second was to evaluate the use of tannic acid (TA), a natural phenolic compound, to cross-link the protein chain and reduce the protein's interaction with water. The levels of 5, 10, 15 and 20% of TA were evaluated. The formation of crosslinking points was observed with all the contents of TA added, significantly reducing the solubility of the films and changing their mechanical properties. The 20% AT content was defined as ideal because it reduced the solubility of the films by 74%, although the flexibility of the films was reduced. Finally, the interaction of oils and TA in their ideal levels was evaluated. It was possible to verify a synergistic effect on the properties with the addition of TA and linseed oil, where a significant reduction in the solubility and moisture absorption of the films was obtained. An increase in tensile strength was also obtained without significantly reducing the elongation of the films. Finally, it was concluded that the use of LO and AT concomitantly makes it possible to obtain films with interesting properties for packaging applications.

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação dos polímeros biodegradáveis de acordo com a fonte do monômero.....	19
Figura 2 - Estrutura química de um aminoácido e formação de uma ligação peptídica. ...	20
Figura 3 - Estrutura química do glicerol.	27
Figura 4 - Estruturas de ligações não-covalentes formadas por proteínas e polifenóis por reticulação via: a) ligação de hidrogênio, b) interação hidrofóbica e c) ligação iônica	33
Figura 5 - Esquema da interação covalente entre proteínas e polifenol a partir da reação de reticulação da proteína por meio de reações alcalinas.....	34
Figura 6 - Estrutura química do ácido tânico.....	35
Figura 7 – Fluxograma das etapas de pesquisa realizadas.....	38
Figura 8 – Fluxograma detalhado da realização da Etapa I.....	38
Figura 9 - Fluxograma detalhado da realização da Etapa II.....	39
Figura 10 - Esquema de produção das amostras da Etapa I.....	40
Figura 11- Esquema de produção das amostras da Etapa II.	41
Figura 12 - Representação do espaço cromático CIELab de cores.....	43
Figura 13 – Variação da temperatura no período estudado.....	45
Figura 14 – Variação da umidade relativa do ar e da umidade do solo no período estudado	46
Figura 15 - Fotografia das amostras de filmes obtidos nas diversas condições avaliadas..	47
Figura 16 - Micrografias da superfície dos filmes produzidos nas diferentes condições de processamento estudadas.....	48
Figura 17 - Resultados de brilho para as amostras avaliadas.....	50
Figura 18 - Variação da tensão na ruptura com as condições de processamento avaliadas	53
Figura 19 – Fotografia dos filmes obtidos com PIS e os diferentes teores de glicerol avaliados.....	54
Figure 20 - Resultados do ensaio de absorção de umidade em 24h para as amostra da Etapa I-b.....	56
Figure 21 - Propriedades mecânicas de tração dos filmes em função do teor de glicerol.	57
Figura 22 - Espectros de FTIR para a amostra controle (PG-C), a PIS e o glicerol (GLI)	60
Figura 23 – Espectros de FTIR para o OL, OC, PG-3OL, PG-3OC e PG-C	61
Figura 24 – Curvas referentes à análise termo gravimétrica para a amostra controle PG-C	62
Figura 25 - Curvas referentes à análise termo gravimétrica para os óleos puros de: a) linhaça e b) coco	63
Figura 26 – Curvas de TG das amostras controle e com os diferentes teores de óleo.....	64

Figura 27 – Curvas de DTG comparativas entre as amostras com diferentes teores de óleos e a amostra controle. a)PG-1OC, b) PG-1OL, c)PG-3OC, d)PG-3OL, e)PG-6OC e f)PG-6OL.....	65
Figura 28 – Fotografia dos filmes obtidos com a adição dos óleos (OC e OL) e filme controle (PG-C)	67
Figura 29 – Resultados do ensaio de tração das amostras avaliadas. a)Tensão na ruptura (MPa) b)Alongamento na ruptura (%).....	70
Figura 30 – Espectro de FTIR do ácido tânico.....	72
Figura 31 – Espectros de FTIR para os filmes controle e com adição dos diferentes teores de ácido tânico (AT).....	73
Figura 32 – Curvas de TG e DTG para o ácido tânico puro.....	74
Figura 33 – Curvas de TG para o filme controle e para os filmes contendo ácido tânico...	75
Figura 34 - Curvas de DTG comparativas entre as amostras com diferentes teores de óleos e a amostra controle. a)PG-5AT, b) PG-10AT, c)PG-15AT, d)PG-20AT.....	75
Figura 35 – Fotografia do filme controle e dos filmes obtidos com a adição de 5, 10, 15 e 20% de ácido tânico (AT), da esquerda para a direita.....	77
Figura 37 – Resultados do ensaio de solubilidade em 24h a 30°C.....	79
Figura 38 - Espectros de FTIR para os filmes avaliados.	82
Figura 39 - Curvas de TG para os filmes avaliados	83
Figura 40 – Curvas de DTG para a amostra controle e para as amostras: a)PG-OCAT e b) PG-OLAT.....	84
Figura 41 – Fotografia dos filmes avaliados	85
Figura 44 – Resultados de absorção de umidade para as amostras com e sem a adição dos óleos e diferentes teores de ácido tânico	89
Figure 45 – Micrografias da superfície de fratura para o filme controle e para os filmes com a adição dos óleos de coco (OC) e linhaça (OL) em conjunto com o ácido tânico, 5Kv e ampliações de 1000x na coluna da esquerda e de 3000x na da direita	91
Figura 44 - Micrografias da superfície de fratura para os filmes contendo ácido tânico, óleos de coco e óleo de linhaça, 5Kv e ampliações de 1000x na coluna da esquerda e de 3000x na da direita	92
Figura 47 – Imagens cronológicas da biodegradação das amostras estudadas	93
Figura 46 – Perda de massa após 28 dias enterradas paras as amostras dos filmes avaliados.....	94
Figura 49 – Aspecto das cebolas no dia 0 e após 16 dias germinando em soluções contendo os filmes avaliados.	95

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição dos aminoácidos presentes na proteína de soja e em suas principais frações.....	23
Tabela 2 – Composição dos ácidos graxos presentes no óleo de coco extra virgem.	29
Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos presentes no óleo de linhaça.....	31
Tabela 4 – Composição e condições de processamento dos filmes avaliados	40
Tabela 5 – Composição dos filmes avaliados	42
Tabela 6 – Propriedades óticas e de cor das amostras da Etapa I-A.....	49
Tabela 7 – Resumo das propriedades de interação com a água.....	51
Tabela 8 – Resumo das propriedades mecânicas (espessura, t ; tensão na ruptura, σ_b ; deformação na ruptura, ϵ_b) das amostras da Etapa IA	52
Tabela 9 – Propriedades óticas e de cor das amostras da Etapa I-B.....	54
Tabela 11 – Propriedades mecânicas das amostras da Etapa I-B	57
Tabela 12 – Dados obtidos dos termogramas das amostras controle e com adição de diferentes teores de OC e OL	66
Tabela 13 – Resultados da análise de colorimetria para as amostras avaliadas na Etapa II-A	67
Tabela 14 – Propriedades de interação com a água das amostras da Etapa II-A	68
Tabela 15 – Propriedades mecânicas das amostras avaliadas na Etapa II-A	70
Tabela 16 - Dados obtidos dos termogramas das amostras controle e com adição de diferentes teores de ácido tânico.....	76
Tabela 17 - Resultados da análise de colorimetria para as amostras avaliadas na Etapa II-B	77
Tabela 18 - Resumo das propriedades de interação com a água	79
Tabela 19 - Propriedades mecânicas das amostras contendo ácido tânico	80
Tabela 20 – Dados obtidos dos termogramas das amostras avaliadas na Etapa II-C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B	84
Tabela 21 - Propriedades óticas e de cor das amostras avaliadas na Etapa II-C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B	87
Tabela 22 - Resumo das propriedades de interação com a água na Etapa II-C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B	88
Tabela 23 - Propriedades mecânicas das amostras avaliadas na Etapa II – C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B	90

Lista de Símbolos

σ_b - Tensão na ruptura

ε_b - Deformação na ruptura

t - Espessura

Lista de Abreviaturas e Siglas

a - Coloração de verde (-a) a vermelho (+a)

ANOVA - Análise de variância

AT - Ácido Tânico

b - Coloração de azul (-b) a amarelo (+b)

AC – Ácido cafeico

AG – Ácido gálico

CIELab - Diagrama de cromaticidade composto por três eixos (a, b e L)

DTG – Termogravimétrica derivada

FE – Ácido felúrico

FTIR – ATR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada

G- Glicerol

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

IFSUL – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense

ISI – Instituto Senai de Inovação

L - Luminosidade que varia de zero (preto) até 100 (branco)

LAPOL – Laboratório de materiais poliméricos

m - massa

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

OC - Óleo de coco

OL - Óleo de linhaça

PCL – Policaprolactona

PIS – Proteína isolada de soja

PLA – Poli ácido-lático

Pva – Permeabilidade ao vapor d'água

RMN - Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

TGA - Análise termogravimétrica

TG – Termogravimetria

UV- Radiação ultra violeta

YS - Yucca schidigera

Sumário

1	Introdução	16
2	Objetivos	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	Revisão Bibliográfica	19
3.1	Filmes biodegradáveis	19
3.2	Proteína de soja	21
3.2.1	Proteína isolada de soja	22
3.2.2	Influência do pH na formação de filmes de proteína de soja	24
3.2.3	Efeito da temperatura na formação de filmes de proteína de soja	25
3.3	Plastificantes	26
3.4	Agentes hidrofóbicos	27
3.4.1	Óleo de Coco	28
3.4.2	Óleo de Linhaça	30
3.5	Agentes reticulantes	31
3.5.1	Ácido Tânico	35
4	Materiais e Métodos	37
4.1	Materiais	37
4.2	Metodologia	37
4.3	Preparo dos filmes	39
4.3.1	Etapa I	39
4.3.2	Etapa II	41
4.4	Caracterização dos filmes obtidos	42
4.4.1	Propriedades avaliadas em todas as etapas	42
	Análise colorimétrica e óptica	42
	Absorção de umidade	43
	Solubilidade	43
	Ensaio mecânico de tração	43
4.4.2	Caracterização da superfície dos filmes – Etapa I-A	44
	Microscopia de Superfície	44
4.4.3	Caracterização química e térmica – Etapa II	44
	FTIR- ATR	44
	Análise Termogravimétrica (TGA)	44
4.4.4	Análises Complementares – Etapa II-C	45
	Microscopia da superfície e superfície de fratura	45
	Biodegradação	45
	Toxicidade	46
4.5	Análise estatística	46
5	Resultados e Discussão	47
5.1	Etapa I	47
5.1.1	Fase A- Estudo das condições de processamento	47
	Características visuais e microestrutura	47

Propriedades de interação com a água	50
Propriedades mecânicas	51
5.1.2 Fase B - Avaliação do teor de glicerol	54
Análise Visual	54
Propriedades de interação com a água	55
Propriedades mecânicas	57
5.2 Etapa II	59
5.2.1 Fase A – Estudo da Adição de agentes hidrofóbicos	59
Espectroscopia de absorção no infravermelho	59
Análise Termogravimétrica	62
Análise Visual	66
Propriedades de interação com a água	68
Propriedades mecânicas	69
5.2.2 Fase B – Estudo da adição de um agente reticulante	71
Espectroscopia de absorção no infravermelho	72
Análise Termogravimétrica	74
Análise visual	76
Propriedades de interação com a água	78
Propriedades mecânicas	80
5.2.3 Fase C - Estudo da interação dos diferentes aditivos	81
Espectroscopia de absorção no infravermelho	82
Análise Termogravimétrica	83
Aspecto Visual	85
Propriedades de Interação com a água	88
Propriedades mecânicas	90
Estudo da biodegradação	93
Estudo da toxicidade	94
6 Conclusões	97
7 Sugestões para trabalhos futuros	99
8 Referências	100

1 Introdução

Desde o início da sua produção até os dias atuais o consumo de polímeros, enquanto plásticos ou matérias de origem petroquímica, cresceu exponencialmente devido a sua grande versatilidade, facilidade de processamento e baixo custo. (JAMBECK et al., 2015; ROCHA et al 2014; TRINETTA et al 2016). A produção mundial destes atingiu cerca de 359 milhões de toneladas em 2018, não incluindo neste valor a quantidade de fibras de poliéster, poliamida e poliacrílicas (Plastic Europe-2019). Dentre suas principais aplicações se destaca o setor de embalagens de bebidas e alimentos, aplicações que utilizam transformados plásticos com menor vida útil, ou seja, de rápido descarte e que tem apresentado um crescimento acelerado nos últimos anos (GONZÁLEZ; ALVAREZ IGARZABAL, 2013). Segundo o relatório da Plastic Europe, as embalagens representaram cerca de 40% do mercado dos plásticos em 2018 (Plastic Europe-2019).

Os plásticos são os artigos encontrados em maior quantidade nos resíduos sólidos urbanos recicláveis. No Brasil estes correspondem a cerca de 42% em massa (Perfil Abiplast -2016), sendo que apenas 13% destes foram reciclados em 2017, segundo dados do Instituto de Pesquisa Aplicada (IPEA-2017). Os resíduos não reciclados geralmente são dispostos em aterros e lixões, e a elevada estabilidade química dos polímeros de origem fóssil, a principio vista como vantajosa por conferir elevada resistência à degradação a estes, se torna uma desvantagem, principalmente, para embalagens quando descartadas no meio ambiente, dando origem a um grave problema ambiental (CARPINÉ et al., 2016; WU; ZHANG, 2001a). Um estudo realizado em 2015 informou que cerca de 6,3 milhões de toneladas de resíduos plásticos foram gerados neste ano e que cerca de 80% destes foi disposto no meio ambiente (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). A poluição dos oceanos com microplásticos têm se tornado um dos principais problemas ambientais da atualidade (PICCHIO et al., 2018a). Eriksen et al. (2014) reportaram que cerca de 5,25 trilhões de partículas, pesando cerca de 270.000 toneladas, foram encontradas no oceano em 2013 (ERIKSEN et al., 2014).

Os dados acima citados corroboram com a ideia de que, embora os esforços da comunidade científica se voltem para o aumento do ciclo de vida útil dos produtos plásticos e para a conscientização quanto à reciclagem, no âmbito das embalagens flexíveis se fazem ainda necessárias soluções alternativas, visto que existe uma grande dificuldade de coleta destes resíduos e que ainda há desconhecimento da população quanto à disposição destas (TRINETTA et al., 2016). Em contrapartida a importância do setor de embalagens é inevitável, no segmento alimentício, por exemplo, estas garantem tanto a proteção, como a integridade dos produtos até a chegada aos consumidores, além de garantir o marketing e a passagem de informações a estes (LANDIM et al., 2016; MAJID; THAKUR; NANDA, 2018).

Desta forma, com o intuito de diminuir os impactos gerados pelos polímeros sintéticos não biodegradáveis, há uma constante busca por materiais alternativos, na qual os polímeros de fonte natural biodegradáveis, têm se mostrado como uma interessante opção de substituição dos polímeros de origem fóssil, pois são renováveis, de baixo custo e biodegradáveis (BOŽIČ et al., 2015; RHIM et al., 2006; SONG et al., 2009; TIAN et al., 2018a).

Dentre os polímeros naturais, as proteínas apresentam propriedades funcionais e estruturais que possibilitam o seu emprego como matriz principal na estrutura de filmes biodegradáveis (SONG et al., 2011b). A proteína de soja (PS) se destaca entre as possíveis matrizes, devido à produção expressiva deste grão no Brasil (115 milhões de toneladas na safra de 2018/2019) e no mundo (362 milhões de toneladas, 2018/2019) (EMBRAPA, 2019). Esta, sendo coproduto da produção de óleos vegetais, se torna uma matéria-prima disponível e abundante, estando comercialmente disponível em três formas: farinha de soja (FS 54% de proteína), concentrado de proteína de soja (CPS 65-72% de proteína) e proteína isolada de soja (PIS \geq 90% de proteína) (LI et al., 2008).

Devido ao seu alto teor de proteína a PIS possui uma alta habilidade de formação de filmes. Além disso, os filmes formados por esta são mais claros, mais regulares e mais flexíveis em comparação com outros filmes à base de proteínas e têm impressionantes propriedades de barreira a gases se comparados com filmes preparados a partir de lipídios e polissacarídeos (SONG et al., 2011 apud Cuq et al, 1995)

No entanto, as propriedades mecânicas e de permeabilidade a água de filmes produzidos com PIS ainda são insuficientes para sua utilização industrial, sendo que é necessária a mistura desta com plastificantes (tipicamente água e polióis) e controle do pH do meio, para obtenção de filmes com propriedades superiores (BOŽIČ et al., 2015; SONG et al., 2011b). Além disto, a alta higroscopicidade destes é um grave problema, pois possibilita a difusão de água pela estrutura, dificultando seu uso em diversas aplicações.

Estudos sugerem que estes efeitos podem ser minimizados de forma satisfatória com tratamentos como a mistura com aditivos hidrofóbicos (CARPINÉ et al., 2016; HONG et al., 2009), formação de blendas e misturas (PARK; HETTIARACHCHY; WERE, 2000) ou com modificações químicas como a reticulação das cadeias do polímero (GONZÁLEZ; STRUMIA; ALVAREZ IGARZABAL, 2011; SONG et al., 2009; YAN et al., 2015).

Sendo assim, neste trabalho, buscou-se avaliar formas de redução da hidrofiliabilidade de filmes a base de proteína de soja isolada. Para isto, estudou-se a utilização de aditivos hidrofóbicos como os óleos de coco (OC) e linhaça (OL) que são compostos por diferentes ácidos graxos, sendo o OC composto majoritariamente por ácidos graxos saturados e o OL por ácidos graxos insaturados, e o efeito da reticulação pela adição de ácido tânico um agente fenólico natural.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar estratégias para a redução da hidrofiliabilidade de filmes a base de proteína de soja, com o uso de aditivos de fonte vegetal.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito dos parâmetros de processamento nas propriedades destes;
- Desenvolver a metodologia de produção de filmes emulsionados via processo de *casting*, à base de proteína de soja com glicerol;
- Avaliar a influência do teor de plastificante nas propriedades dos filmes;
- Definir o teor ideal de plastificante;
- Avaliar o efeito da incorporação dos óleos de coco e de linhaça nas propriedades de dos filmes, buscando redução da hidrofiliabilidade destes;
- Avaliar o efeito da incorporação de ácido tânico nas propriedades dos filmes, buscando a redução da hidrofiliabilidade destes;
- Avaliar a interação dos diferentes aditivos utilizados nos filmes através das propriedades físicas e químicas;
- Avaliar a degradabilidade e toxicidade dos filmes obtidos.

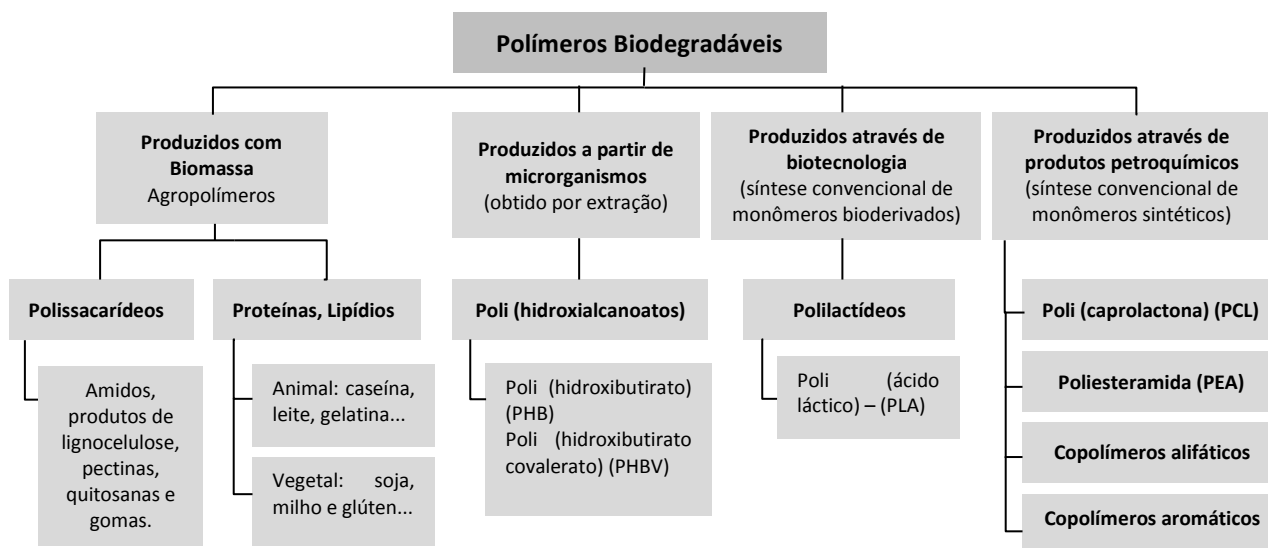
3 Revisão Bibliográfica

3.1 Filmes biodegradáveis

Polímeros biodegradáveis são formados por macromoléculas que são reconhecidas pelas enzimas presentes na natureza e metabolizadas (oxidadas ou hidrolisadas) rapidamente por microrganismos gerando biomassa, gás carbônico e água. Desta forma, estes podem ser geridos através da compostagem, método menos agressivo para o ambiente que a disposição em aterros ou a incineração (Scott, 1999).

Avérous e Boquillon (2004) classificaram os polímeros biodegradáveis de acordo com a origem dos monômeros em quatro famílias, a de biomassa, microrganismo, biotecnologia e de petroquímico. Essa classificação pode ser observada na Figura 1. A família biomassa corresponde aos chamados “agropolímeros”, os quais são extraídos de plantas e animais; a família de microrganismo corresponde aos polímeros sintetizados por bactérias obtidos por extração; a família biotecnológica corresponde aos polímeros sintetizados por técnicas convencionais de polimerização cuja matéria-prima é obtida de fontes renováveis; e a família petroquímica corresponde aos polímeros sintetizados por técnicas convencionais de polimerização cuja matéria-prima é de fonte não renovável (AVEROUS; BOQUILLON, 2004).

Figura 1 - Classificação dos polímeros biodegradáveis de acordo com a fonte do monômero.



Adaptado de Avérous e Boquillon (2004)

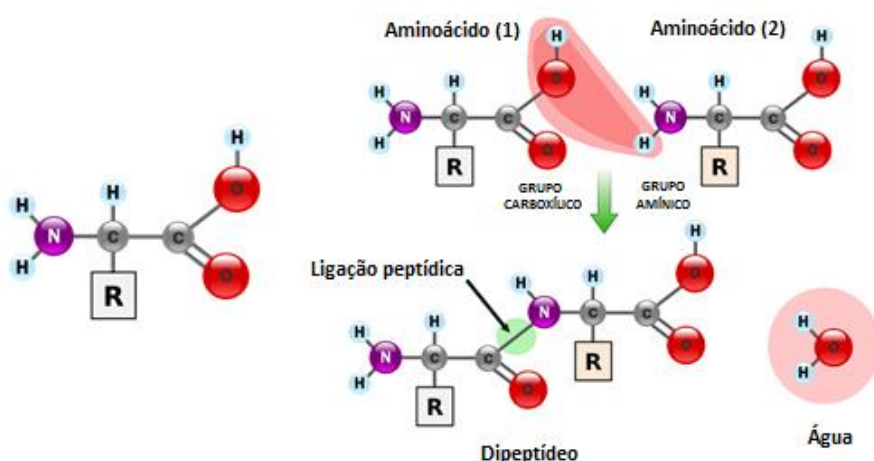
Diversas fontes naturais têm sido utilizadas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis, alguns exemplos são os polissacarídeos como o amido, a celulose, a quitosana e as gomas; proteínas como as extraídas de animais (caseína, colágeno, gelatina) e derivadas de plantas (soja, zeína e glúten) e lipídios, incluindo triglicerídeos de ligação cruzada (BERTAN et al., 2005; KARNNET; POTIYARAJ; PIMPAN, 2005; PÉREZ-GAGO; NADAUD; KROCHTA, 1999).

Proteínas vegetais, como a proteína de soja, o glúten de trigo e a zeína do milho tem sido extensivamente estudados com o fim de desenvolver filmes biodegradáveis que possam substituir os feitos com polímeros sintéticos. As proteínas vegetais são derivadas de recursos renováveis, e geralmente são coprodutos de processos industriais, tendo suas aplicações limitadas e, desta forma, sendo relativamente baratos. Muitos autores relatam que as proteínas vegetais possuem propriedades únicas, como uma baixa permeabilidade ao oxigênio que as tornam preferíveis aos filmes de alguns polímeros sintéticos para embalagens de alimentos entre outras aplicações (GUILBERT *et al*, 1996; REDDY e YANG, 2013).

Muitos autores têm estudado o uso de diferentes tipos de proteínas (tanto de origem animal como vegetal) como fonte de produção de materiais biodegradáveis, alguns exemplos são: proteína isolada de soja (ATARÉS *et al.*, 2010a; CARPINÉ *et al.*, 2016; HOPKINS *et al.*, 2015a), gelatina (ANDREUCETTI *et al.*, 2011; BERTAN *et al.*, 2005), proteína de soro de leite (RAMOS *et al.*, 2013), glúten de trigo (MARCUSOZZO *et al.*, 2011), zeína (proteína do milho) (CHO; LEE; RHEE, 2010), proteína de quinoa (VALENZUELA; ABUGOCH; TAPIA, 2013), entre outros.

As proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por unidades mais simples que se polimerizam para construir uma estrutura mais complexa, estas unidades são os aminoácidos dos quais existem 21 tipos diferentes na natureza. Os aminoácidos são estruturas formadas sempre por um grupo carboxílico (COOH), um grupo amínico (NH₃), um carbono assimétrico e uma cadeia lateral, conforme pode ser visualizado na Figura 2. Estes se ligam por meio de ligações peptídicas que são o resultado da remoção de uma molécula de água entre o grupo carboxílico de um aminoácido e o grupo amínico de outro (NEVES e VIEIRA, 1991).

Figura 2 - Estrutura química de um aminoácido e formação de uma ligação peptídica.



Fonte Yassine Mrabet (2019)

As proteínas possuem estruturas espaciais, que podem ser organizadas em quatro níveis crescentes de complexidade. A estrutura primária é caracterizada pela ordem sequencial linear de aminoácidos e determina sua estrutura tridimensional, sua estabilidade termodinâmica, padrão de distribuição de cargas na superfície, distribuição

dos grupamentos hidrofóbicos ou hidrofílicos na superfície e no interior de sua estrutura (NEVES e VIEIRA, 1991; DAMODARAN, 2008). A estrutura secundária refere-se aos arranjos estáveis dos resíduos de aminoácidos, os quais são estabilizados por ligações de hidrogênio, de Van der Waals, interações eletrostáticas e pontes de dissulfeto. A estrutura terciária descreve os desdobramentos tridimensionais das cadeias polipeptídicas, sendo estabilizada por interações intermoleculares entre as cadeias laterais. A estrutura quaternária é o arranjo espacial de duas ou mais subunidades polipeptídicas de uma proteína (NELSON e COX, 2002; DAMODARAN *et al.*, 2008). Devido a sua estrutura e propriedades intrínsecas, as proteínas apresentam propriedades funcionais que permitem a formação de filmes (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009; HAMMANN; SCHMID, 2014).

De maneira geral os filmes biodegradáveis originados de fontes proteicas são formados a partir de redes macromoleculares contínuas, de estrutura relativamente ordenada. Os filmes proteicos são estabilizados por forças de Van der Waals, ligações covalentes, pontes dissulfeto, interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009; PÉREZ-GAGO; NADAUD; KROCHTA, 1999). Os fatores que afetam essas interações, e conseqüentemente modificam as propriedades dos filmes incluem: (1) interação entre proteínas e moléculas como água, plastificantes, lipídios e outros aditivos dispersos na matriz; (2) aplicação de tratamentos físicos, como o calor, cisalhamento, pressão e irradiação; (3) adição de bases ou ácidos; (4) aplicação de tratamentos enzimáticos. A partir destes processos, as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias podem ser modificadas para melhorar a interação da proteína com os demais componentes, e assim melhorar a estabilidade e as propriedades desses filmes (PÉREZ-GAGO, 2012; ZHANG e MITTAL, 2010).

Sendo assim, as proteínas vegetais se tornam alternativas interessantes aos polímeros sintéticos e, sendo a soja uma das principais culturas no Brasil a proteína de soja se torna um recurso abundante e disponível para a aplicação como embalagens e filmes poliméricos em geral.

3.2 Proteína de soja

A proteína de soja tem sido uma das principais proteínas vegetais estudadas no âmbito dos filmes biodegradáveis, por suas boas propriedades de formação de filmes e pela grande disponibilidade de matéria-prima. A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das principais culturas de grãos no mundo sendo que o Brasil é o segundo maior produtor (EMPRAPA, 2019). O conteúdo proteico desta, coproduto da produção de óleos vegetais, está comercialmente disponível em três formas classificadas de acordo com o seu teor de proteína: farinha de soja (FS, 54% de proteína), concentrado de proteína de soja (PCS, 65-72% de proteína) e proteína isolada de soja (PIS, $\geq 90\%$ de proteína) (LI *et al.*, 2008). Devido ao seu alto teor de proteína, a PIS possui melhor habilidade de formação de filmes se comparada às demais formas de proteína de soja disponibilizadas (SONG *et al.*, 2011b). Esta é obtida através de extração das proteínas solúveis em água por meio de uma solução com pH entre 8-9 seguida de precipitação em pH 4,5, centrifugação e secagem (BUFFO; HAN, 2005; CARPINÉ *et al.*, 2015).

3.2.1 *Proteína isolada de soja*

A proteína isolada de soja é uma mistura complexa de proteínas com propriedades moleculares muito distintas. Assim como as demais proteínas estas são macromoléculas biológicas constituídas pela ligação de diferentes aminoácidos por meio de ligações peptídicas (NEVES e VIEIRA, 1991). As cadeias polipeptídicas da proteína de soja estão associadas e emaranhadas em uma complicada estrutura tridimensional por meio de ligações dissulfeto e pontes de hidrogênio e sua massa molar pode variar entre 300 a 600 kDa. Suas proteínas podem ser divididas em albuminas, solúveis em água, e globulinas, solúveis em solução salina. Sendo em sua maioria globulinas, contendo cerca de 25% de aminoácidos ácidos, 20% de aminoácidos básicos e 20% de aminoácidos hidrofóbicos (SUN, 2005).

As globulinas podem ser fracionadas em quatro diferentes tipos (2S, 7S, 11S e 15S) de acordo com os seus coeficientes de sedimentação. A β -conglucina (7S) e a glicina (11S) são as duas principais frações da proteína de soja sendo seus teores geralmente referidos na faixa de 30-50% para a β -conglucina e de 20-30% para a glicina. Estas são as frações da proteína que possuem capacidade de polimerização, sendo globulinas compostas pela união de duas ou mais subunidades, as quais são formadas por pequenas cadeias polipeptídicas (KOKOSZKA et al., 2010; SEUNG; RHEE, 2004; SUN, 2005).

As globulinas 7S são glico-proteínas triméricas compostas de seis diferentes combinações de três subunidades associadas via interações hidrofóbicas e sua massa molar geralmente está na faixa de 200-400 kDa. Já as globulinas 11S são constituídas por dois anéis hexagonais sobrepostos, cada um contendo três pares dissulfeto hidrofobicamente associados e ligados a subunidades ácidas e básicas. Sua massa molar está na faixa de 100-200 kDa (KOKOSZKA et al., 2010; SEUNG; RHEE, 2004; SUN, 2005; UTSUMI; KINSELLA, 1985). A composição aproximada dos aminoácidos que compõem a proteína de soja e suas principais componentes é dada na Tabela 1.

A proteína de soja consiste, principalmente de aminoácidos ácidos (aspártico e glutâmico) e suas amidas correspondentes (aspargina e glutamina), aminoácidos não-polares (alanina, valina e leucina), aminoácidos básicos (lisina e arginina), aminoácidos polares não carregados (glicina) e aproximadamente 1% de cisteína (SUN, 2005). A distribuição de aminoácidos carregados, polares e não polares ao longo da cadeia gera um potencial químico ao longo da estrutura, resultando em forças que levam a formação de uma matriz coesa (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009). Além disso, a grande diversidade de grupos funcionais derivados dos aminoácidos resulta em forças interativas capazes de melhorar a estabilidade dos filmes (DANGARAN; TOMASULA; QI, 2009; HAMMANN; SCHMID, 2014)

Tabela 1 – Composição dos aminoácidos presentes na proteína de soja e em suas principais frações.

Aminoácidos	Proteína de Soja (%)	Glicinina da Soja (%)	β-Conglicinina da Soja (%)
Triptofano	-	0,75	0,30
Isoleucina	2,86	4,24	6,40
Tirosina	2,57	2,81	3,60
Fenilalanina	3,92	3,85	7,40
Prolina	5,73	6,85	4,30
Leucina	8,02	7,05	10,30
Valina	3,39	4,83	5,10
Lisina	5,88	4,44	7,00
Metionina	1,23	0,98	0,30
Cisteína	0,99	1,44	0,00
Alanina	6,05	5,16	3,70
Arginina	4,68	5,81	8,80
Treonina	4,05	3,91	2,80
Glicina	9,74	7,50	2,90
Serina	7,46	6,66	6,80
Histidina	5,00	1,89	1,70
Aspartato	11,55	11,88	14,10
Glutamato	16,89	19,97	20,50

Adaptado de Sun (2005)

A formação de filmes de proteínas de soja tem sido estudada por diversos autores devido as suas propriedades estruturais e funcionais que permitem a formação de estruturas com características adequadas para sua utilização como embalagem (CARPINÉ et al., 2016; FERNANDES NASSAR et al., 2018; GALUS, 2018; HOPKINS et al., 2015a). De maneira geral, a produção de filmes de PIS é descrita como um processo de duas etapas envolvendo a desnaturação térmica da proteína seguida pela desidratação superficial. A desnaturação se trata de modificações da estrutura nativa de uma proteína, dando origem a alterações nas propriedades químicas, físicas ou biológicas. Quando esta é leve pode perturbar estruturas terciárias ou quaternárias, podendo ser um processo reversível, enquanto condições mais severas de desnaturação podem fragmentar a cadeia. (NÖLTING; NÖLTING, 2004).

Após a secagem dos filmes, as proteínas desdobradas se ligam através de interações intermoleculares, tais como ligações dissulfureto e interações hidrofóbicas, levando à formação de uma rede (KOKOSZKA et al., 2010; SEUNG; RHEE, 2004). Desta forma, as propriedades finais do filme estão diretamente relacionadas à estrutura desta rede formada e das interações entre as proteínas, plastificantes e os demais aditivos adicionados (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1998; PÉREZ-GAGO; NADAUD; KROCHTA, 1999; SEUNG; RHEE, 2004).

O método de *Casting* tem sido uma das principais formas estudadas para obter filmes de PIS. Este é baseado na solubilização do polímero em um solvente, na qual são utilizados, basicamente, agente formador do filme (macromolécula), solvente (água, etanol ou ambos), plastificante (glicerol ou sorbitol) e agente ajustador de pH. Após a

mistura e solubilização destes componentes o material deve ser secado para retirada do solvente ocorrendo então a formação do filme (GUERRERO et al., 2010; TIAN et al., 2018b).

A interação com a água é muito importante para manter a estrutura tridimensional das proteínas e, esta afeta suas propriedades físico-químicas, funcionais e seu comportamento durante o processamento. Segundo Sun (2005) quanto maior o teor de água, maior a interação desta com as moléculas de proteína aumentando a mobilidade do sistema, ou seja, possuindo efeito plastificante, além disto, um aumento no teor desta pode reduzir a temperatura de desnaturação e a estabilidade térmica da proteína (SUN, 2005).

3.2.2 Influência do pH na formação de filmes de proteína de soja

As proteínas são um tipo de polieletrólito e, desta forma, a variação de pH influencia o comportamento de associação e dissociação da proteína em solução aquosa. Em pH próximo ao ponto isoelétrico (pH 4,5) a PIS se coagula ao invés de se dispersar em água, não permitindo assim, nestas condições, a moldagem por *casting*. A PIS pode ser desdobrada e desnaturada em pHs distantes da região isoelétrica, expondo grupos sulfídricos e hidrofóbicos que podem se auto associar e formar novas ligações durante a formação do filme. Em condições extremas ácidas e alcalinas, as fortes forças repulsivas de cargas altamente negativas ou positivas estão presentes ao longo das cadeias proteicas, o que impede que as moléculas de proteínas se associem e formem filmes (GENNADIOS et al., 1993; SONG et al., 2011b).

Gennadios *et al.* (1993) estudaram o efeito do pH na formação de filmes produzidos por *casting*, nas propriedades mecânicas e de permeabilidade da proteína isolada de soja e do glúten do trigo e verificaram que em pH entre 1-3 (abaixo do ponto isoelétrico) ocorre baixa dispersão da proteína e em pH na faixa de 6-11 é possível obter filmes com maiores valores de resistência a tração, maiores elongações na ruptura e menor permeabilidade ao vapor d'água (GENNADIOS et al., 1993).

Mauri e Anon (2006) avaliaram a mudança na solubilidade e nas propriedades moleculares de filmes de PIS utilizando diferentes pH (2, 8 e 11) no preparo dos filmes. Estes observaram que em pH 8 a proteína manteve sua conformação original durante a formação do filme, já nos pH 11 e 2 estas foram parcialmente e extensivamente desnaturadas, respectivamente. Os autores concluíram que em valores extremos de pH as associações cadeia-cadeia são facilitadas obtendo-se assim microestruturas mais densas (MAURI; AÑÓN, 2006).

Cho *et al* (2007) investigaram o efeito da variação do pH (7, 8, 9 e 10) nas propriedades de filmes de PIS plastificado com glicerol e verificaram que os filmes preparados em condições alcalinas (pH 8-10) foram mais resistentes a ruptura e mais flexíveis. A permeabilidade ao vapor d'água (Pva) dos filmes não foi influenciada pelo pH, enquanto que a permeabilidade ao oxigênio decresceu com o aumento do pH (CHO et al., 2007).

3.2.3 Efeito da temperatura na formação de filmes de proteína de soja

O tratamento térmico das soluções formadoras de filme de PIS é essencial, pois a proteína é formada por interações proteína-proteína catalisadas pelo calor, onde as principais forças envolvidas nessas interações são ligações de dissulfeto, de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. Assim, o aquecimento é necessário para a formação destas ligações, uma vez que altera a estrutura tridimensional das proteínas e leva a exposição dos grupos sulfídricos e as cadeias laterais hidrofóbicas (BUFFO; HAN, 2005; CARPINÉ et al., 2015; SONG et al., 2011b).

Stuchell e Krochta (1994) compararam as propriedades de filmes produzidos por uma solução não aquecida e uma aquecida a 85°C. Os resultados mostraram que os filmes aquecidos apresentaram menor permeabilidade ao vapor d'água, maior tensão na ruptura e apresentaram um aumento da elongação na ruptura se comparado ao filme não aquecido. O tratamento térmico da solução formadora de filme desnaturou as proteínas da soja, o que permitiu aumento das interações proteína-proteína, maior compactamento das cadeias poliméricas e redução da mobilidade destas (STUCHELL; KROCHTA, 1994).

O estudo de Pérez-Gago e Krochta (2001) revelou que a permeabilidade ao oxigênio dos filmes isolados de proteína de soro de leite feitos a partir de solução aquecida a 90 ° C por 30 min foi significativamente menor que a dos filmes feitos a partir da solução não aquecida. Curiosamente, a permeabilidade à água dos filmes não foi afetada pelo tratamento térmico (PÉREZ-GAGO; NADAUD; KROCHTA, 1999). A capacidade dos filmes tratados termicamente de suportar deformações mais altas foi atribuída ao desdobramento da estrutura globular da proteína do soro de leite, que expõe os grupos S-H que foram orientados para o interior da molécula antes do tratamento permitindo a formação de fortes ligações covalentes de dissulfeto intermoleculares (PÉREZ-GAGO; NADAUD; KROCHTA, 1999; WIHODO; MORARU, 2013).

Sun *et al* (2005) abordou um efeito interessante que ocorre no comportamento ao aquecimento das proteínas quando há presença de água. O aumento da concentração de água provoca uma redução tanto na temperatura de desnaturação quanto na estabilidade térmica da proteína. Sendo a água o principal solvente utilizado no processamento da proteína de soja por *casting* é interessante considerar os efeitos desta nas condições de processamento (SUN, 2005).

Os estudos apresentados até o momento demonstram que a PIS possui boas características de formação de filme e grandes perspectivas de utilização quanto matéria-prima para produção de embalagens biodegradáveis, no entanto, o setor de embalagens alimentícias exige que o produto seja capaz de manter as propriedades organolépticas do produto e desta forma, boas propriedades de barreira a gases e a umidade são exigidas. (CARPINÉ et al., 2015; SONG et al., 2011b; TIAN et al., 2018a) A PIS, um material higroscópico e com alta permeabilidade a água, apresenta propriedades mecânicas reduzidas o que exige a adição de plastificantes para a formação de peças não rígidas, no entanto estes elevam esta natureza hidrofílica da proteína. Desta forma, pesquisas que avaliem o uso de agentes hidrofóbicos e reticulantes que reduzam estas características do

material se tornam interessantes para se obter um produto que garanta as propriedades exigidas pelo mercado.

3.3 Plastificantes

Peças feitas exclusivamente a partir de proteínas da soja são rígidas e quebradiças, pois a forte carga e as interações polares entre as cadeias laterais das moléculas da proteína restringem a rotação do segmento e a mobilidade molecular. Isto leva a um aumento da rigidez, do limite de escoamento e da resistência à tração originando plásticos de proteína de soja frágeis (MEKONNEN et al., 2013). Desta forma, para a obtenção de filmes com boas propriedades mecânicas é essencial a adição de um plastificante, pois este reduz a interação entre moléculas de proteína e aumenta a flexibilidade, extensibilidade e processabilidade de plásticos de proteína de soja (VIEIRA et al., 2011).

Um plastificante pode se interpor entre as cadeias da proteína diminuindo as forças que mantêm as cadeias poliméricas unidas. O efeito plastificante ocorre devido à habilidade das moléculas deste de se interporem dentro da rede tridimensional da proteína aumentando o volume livre e facilitando a mobilidade das cadeias poliméricas. Ao fazê-lo, o plastificante atua como um lubrificante para facilitar os movimentos das cadeias umas sobre as outras, interrompendo as ligações proteína-proteína incluindo as ligações de hidrogênio e de Van der Waals e as forças iônicas, e, assim, diminuindo a temperatura de transição vítrea e aumentando o volume livre da proteína (ORTEGA-TORO et al., 2014; WANG; SUE; JANE, 1996; WOOL; SUN; SUN, 2005b).

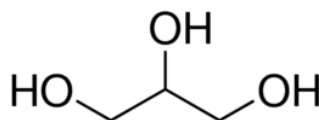
Plastificantes com baixa polaridade são competidores ruins para sítios de ligação de hidrogênio e são menos eficazes em interromper as interações intermoleculares em uma matriz proteica quando comparados aos plastificantes polares (WIHODO; MORARU, 2013). Os plastificantes utilizados na produção de filmes biodegradáveis incluem monossacarídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos (glicose, frutose, sacarose, entre outros) polióis incluindo glicerol, sorbitol e glicóis de polietileno, lipídios e derivados (fosfolipídios, ácidos graxos e surfactantes) (SANTACRUZ; RIVADENEIRA; CASTRO, 2015; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000b). Além disto, a água possui um efeito plastificante muito eficaz para materiais biopoliméricos, e por isto a produção de filmes pelo método de *casting* se torna muito interessante (REDDY e YANG, 2013).

Polióis têm sido frequentemente utilizados como plastificantes para melhorar a processabilidade, flexibilidade e extensibilidade da PIS. Mo e Sun (2002) estudaram o efeito de diferentes polióis (glicerol, propilenoglicol, 1,2-butanodiol e 1,3-butanodiol) como plastificantes em filmes de PIS produzidos por compressão térmica. As principais características que diferenciam os polióis avaliados são o tamanho molecular e a posição da hidroxila. Os autores avaliaram as propriedades mecânicas, térmicas e de absorção de umidade das amostras. Estes observaram que o glicerol e o propilenoglicol apresentaram maior interação com a proteína de soja do que os butanodióis, por possuírem uma cadeia menor e mais hidrofóbica, apresentando assim menor redução da temperatura de desnaturação. A proteína da soja tem uma estrutura tridimensional, com os grupos hidrofóbicos no interior e os grupos hidrofílicos voltados para fora. Para desnaturar as

proteínas, os reagentes químicos devem primeiro romper a casca hidrofílica e depois penetrar na região hidrofóbica. Polióis contendo o grupo polar hidroxila podem efetivamente romper o invólucro hidrofílico. A capacidade de penetração destes aumenta com sua hidrofobicidade (FUKUSHIMA, 1969). Quanto às propriedades mecânicas o glicerol apresentou maior alongação na ruptura com menor redução da tensão na ruptura que os demais plastificantes. Como esperado, todos os polióis elevaram a absorção de umidade, mas não houve diferença significativa entre estes (MO & SUN, 2002).

O glicerol, também chamado de 1,2,3-propanotriol, é um composto orgânico pertencente a função álcool, sendo um líquido viscoso a temperatura ambiente (25°C), incolor e inodoro. Este é biocompatível, não tóxico e apresenta boa estabilidade térmica, sendo seu ponto de ebulição a 290°C. Conforme demonstrado na Figura 3, sua estrutura conta com 3 grupos hidroxila associados a uma cadeia carbônica com três carbonos (BOŽIČ et al., 2015).

Figura 3 - Estrutura química do glicerol.



Fonte: Sigma-Aldrich

3.4 Agentes hidrofóbicos

Os lipídios são uma classe de compostos de estrutura altamente diversificada, cuja única característica comum é sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água, propriedade que ocorre devido ao componente hidrocarboneto expressivo que também é responsável pela propriedade oleosa da molécula (NEVES e VIEIRA, 1991). Estes podem ser adicionados à formulação de filmes biodegradáveis com o objetivo de aumentar a hidrofobicidade e assim minimizar a migração de vapor de água destas estruturas. Entretanto, a incorporação de lipídios na estrutura de filmes pode levar ao aumento da opacidade e diminuição nas propriedades mecânicas destes, dependendo da estrutura e da composição dos lipídios utilizados. O efeito positivo resultante da incorporação dos lipídios nas matrizes poliméricas depende da natureza do lipídio utilizado (organização dos cristais e tamanho das cadeias dos ácidos graxos), da sua hidrofobicidade, do estado físico (líquido ou sólido), e das interações destes com os demais componentes do filme (BERTAN et al., 2005; BRAVIN; PERESSINI; SENSIDONI, 2004; QUEZADA GALLO et al., 2000).

Os componentes lipídicos comumente utilizados na preparação de filmes incluem principalmente ácidos graxos e ceras (BERTAN et al., 2005; CARPINÉ et al., 2015; SAUCEDO-POMPA et al., 2009). Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa podendo ser saturados ou insaturados. Quando saturados, possuem apenas ligações simples entre os carbonos, e os insaturados possuem, no mínimo, uma ligação dupla no seu esqueleto carbônico sendo assim mais reativos que os saturados (MALLÉGOL; LEMAIRE; GARDETTE, 2000).

Ácidos carboxílicos são compostos orgânicos naturais que possuem dois grupos funcionais: carbonila (-CO) ligada a um grupo hidroxila (-OH). Esta junção também é chamada de carboxila, e é normalmente escrita na forma -COOH. Este grupo pode realizar ligações de hidrogênio, agindo como doador/receptor deste elemento. Esses ácidos contêm uma parte polar (carboxila) e outra apolar (cadeia carbônica), e são usados em diversas aplicações industriais em diferentes setores, sendo encontrados naturalmente em plantas e animais (PATAI, 1969).

Os óleos vegetais são formados por diferentes ácidos graxos, estes são extraídos de frutos, sementes e plantas e podem ser facilmente encontrados comercialmente. (GIOIELLI, 1996). O óleo de coco é formado principalmente por ácidos graxos saturados e contem também alguns compostos fenólicos em sua composição, já o óleo de linhaça é formado principalmente por ácidos graxos insaturados. Ambos os óleos serão mais bem apresentados nos subcapítulos que seguem.

3.4.1 Óleo de Coco

O óleo de coco (OC) extra virgem é um óleo vegetal obtido a partir da polpa fresca e madura (copra) do coco (*Cocos nucifera L.*) por prensagem mecânica ou natural, com ou sem a aplicação de calor, seguido da quebra da emulsão para separação do óleo. O óleo de coco extra virgem não é submetido ao processo de refinamento, branqueamento e desodorização (CARPINÉ, 2015).

A fração saponificável do OC é composta predominantemente de ácidos graxos saturados, e dentre estes o principal é o ácido láurico (45 – 53%) (CARPINÉ et al., 2015; MARINA et al., 2009; O'BRIEN, 2004). Na Tabela 2 está listada a composição dos ácidos graxos do óleo de coco extra virgem de acordo com as normas padrões vigentes.

Os óleos ou gorduras onde o ácido láurico é predominante apresentam características acentuadas de fusão. O óleo de coco, por exemplo, apresenta consistência dura e quebradiça à temperatura de 21,1°C, mas funde-se completamente abaixo da temperatura corporal (O'BRIEN, 2004). A fração insaponificável deste (aproximadamente 0,5%) é constituída principalmente por tocoferóis, esteróis, pigmentos e carboidratos (CARPINÉ, 2015, CANAPI et al., 2005).

Tabela 2 – Composição dos ácidos graxos presentes no óleo de coco extra virgem.

Ácidos Graxos	Formula	Estrutura	Composição do OC (%)
Ác. Caproico (C6:0)	C ₆ H ₁₂ O ₂		ND - 0,7
Ác. Caprílico (C8:0)	C ₈ H ₁₆ O ₂		4,6 – 10
Ác. Cáprico (C10:0)	C ₁₀ H ₂₀ O ₂		5 - 8
Ác Laurico (C12:0)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂		45,1 - 53,2
Ác. Mirístico (C14:0)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂		16,8 - 21
Ác. Palmítico (C16:0)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂		7,5 - 10,2
Ác. Esteárico (C18:0)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂		2 – 4
Ác. Oleico (C18:1)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂		5 – 10
Ác. Linoléico (C18:2)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂		1 - 2,5
Ác Linolênico (C18:3)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂		ND - 0,2
Ác. Ecosanóico (C20:0)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂		ND - 0,2
Ác. Gondóico (C20:1)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂		ND - 0,2

Adaptado de Carpiné (2015).

O elevado teor de ácidos graxos saturados e os tocoferóis presentes na fração insaponificável do óleo de coco conferem a este excelente estabilidade oxidativa, característica pouco comum entre os óleos de origem vegetal (O'BRIEN, 2004; CANAPI *et al.*, 2005; CARPINÉ *et al.*, 2015). Outra característica importante deste é a atividade antioxidante relatada por pesquisadores devido à presença de compostos fenólicos (BINSI; RAVISHANKAR; SRINIVASA GOPAL, 2013; MARINA *et al.*, 2009b).

O efeito da adição de OC nas propriedades físicas, mecânicas e de barreira a gases e ao vapor de água em filmes de quitosana foram avaliados por Binsi *et al.* (2013). A adição de OC resultou na melhora da barreira a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes, com redução máxima de 80,5% quando comparado ao controle. Segundo os autores, com a incorporação de OC na matriz, os grupos ativos e hidrofílicos da quitosana se tornam menos disponíveis para interações com a água, diminuindo o caráter hidrofílico do material. Outro mecanismo proposto pelos autores pode ser correlacionado com a

presença dos compostos fenólicos no óleo de coco (11,3 mg GAE/100 g de OC). A estrutura dos componentes fenólicos é caracterizada por um grupo hidroxil ligado ao anel aromático, o qual pode estabelecer interações, como ligações de hidrogênio, com os grupos reativos da quitosana, limitando assim a disponibilidade dos grupos contendo hidrogênio em se ligarem a água. A redução nas interações entre as cadeias de quitosana devido à inserção de OC na estrutura levou a formação de filmes mais flexíveis e menos resistentes, demonstrando que o OC pode ter atuado como lubrificante na rede polimérica, fornecendo aos filmes maior flexibilidade (BINSI; RAVISHANKAR; SRINIVASA GOPAL, 2013).

Carpiné *et al.* (2016) estudou o efeito da adição de óleo de coco virgem emulsificado com a saponina *Yucca schidigera* (YS). Foram realizadas análises de solubilidade, opacidade, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, propriedades morfológicas e estruturais. Em geral, todas as propriedades foram influenciadas pela incorporação do óleo de coco virgem e / ou surfactante, com exceção de sua solubilidade em água. Os filmes contendo este aditivo apresentaram efeito plastificante: maior flexibilidade (aumento do alongamento em aproximadamente 71%) e leve redução na resistência à tração. A permeabilidade ao vapor de água dos filmes à base de emulsão foi reduzida em 35,4% quando comparada ao filme PIS sem o OC e YS (CARPINÉ *et al.*, 2016).

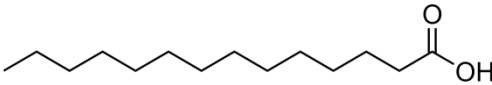
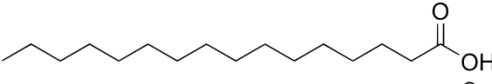
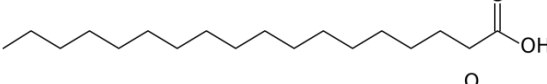
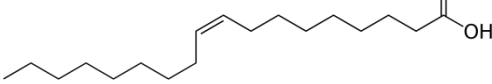
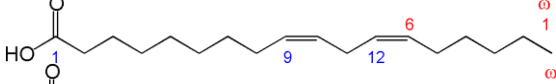
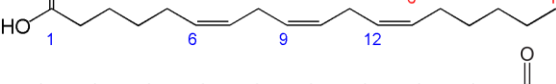
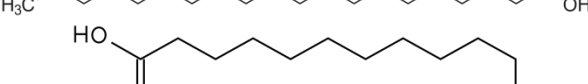
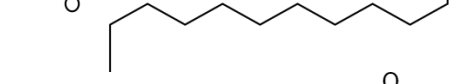
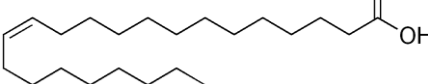
3.4.2 Óleo de Linhaça

O óleo de linhaça (OL) é um óleo vegetal, de coloração alaranjada e sabor levemente amargo. Este é obtido da semente de linhaça que é um alimento originário da planta do linho, pertencente à família das Lináceas (*Linum usitatissimum*). A humanidade tem consumido a semente de linhaça desde a antiguidade sendo considerada uma notável antioxidante e imunoestimulante por ser uma fonte rica em ômega-3 ou ácido α -linolênico (HOPKINS *et al.*, 2015b).

A incorporação deste óleo em filmes pode tanto aumentar o valor nutricional deste quanto utilizar a natureza hidrofóbica do óleo para reduzir a penetração de umidade e a permeabilidade ao vapor d'água do filme. Foi relatado que fatores como polaridade, saturação lipídica e homogeneidade afetam a permeabilidade ao vapor de água desses filmes (HOPKINS *et al.*, 2015b; JANJARASSKUL; KROCHTA, 2010; MORILLON *et al.*, 2002). O óleo de linhaça, assim como os demais óleos vegetais é formado por diferentes ácidos graxos, sendo que a composição aproximada destes pode ser conferida na Tabela 3.

O OL é rico em ácidos graxos essenciais, ou seja, ácido linolênico, oleico e linoleico, além de vitaminas como as vitaminas E e A, sendo um ingrediente importante em produtos alimentícios funcionais (GOYAL *et al.*, 2014). No entanto, estes ácidos graxos poliinsaturados presentes são altamente suscetíveis à oxidação e podem formar radicais livres ativos na presença de calor, luz, espécies reativas de oxigênio ou metais que se transformam em hidro peróxidos e produtos de oxidação secundária (CHOE; MIN, 2006).

Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos presentes no óleo de linhaça.

Ácidos Graxos	Formula	Estrutura	Composição do OL (%)
Ác. Mirístico (C14:0)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂		<0,1 - 0,1
Ác. Palmítico (C16:0)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂		5,1 - 5,3
Ác. Esteárico (C18:0)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂		4,3 - 5,1
Ác. Oleico (C18:1)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂		15,8 - 20,0
Ác. Linoleico (C18:2)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂		16,5 - 17,8
Ác. Linolênico (C18:3)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂		50,7 - 58,3
Ác. Ecosanóico (C20:0)	C ₂₀ H ₄₀ O ₂		<0,1 - 0,3
Ác. Behênico (C22:0)	C ₂₂ H ₄₄ O ₂		ND - 0,2
Ác. Erúxico (C22:1)	C ₂₂ H ₄₂ O ₂		ND - 0,3

Adaptado de LEWINSKA et al., 2015.

Desta forma, o óleo de linhaça tem sido largamente utilizado ao longo dos anos, principalmente na indústria de tintas e vernizes, como óleo secante, devido a presença de grandes concentrações de ácidos graxos insaturados neste. Estes formam triglicerídeos que se oligomerizam ou polimerizam em contato com o oxigênio possibilitando que este apresente a formação de fortes interações com a matriz polimérica (LLIGADAS et al., 2013; ZHANG et al., 2017).

Hopkins *et al.* (2014) estudaram o efeito da adição de diferentes teores de óleo de linhaça (1-10%) em filmes de PIS, avaliando as características mecânicas e físicas do filme e a influência do teor deste na permeabilidade ao vapor d'água, teor de umidade e inchamento do filme em água. Os autores verificaram que o aumento da concentração de óleo provocou um aumento da elongação na ruptura do filme e aumento da resistência à ruptura dos filmes até uma concentração intermediária de óleo. A permeabilidade ao vapor d'água (Pva) apresentou um comportamento independente do teor de óleo adicionado, já o teor de umidade e o inchamento foram reduzidos com o aumento do teor de óleo (HOPKINS et al., 2015a).

3.5 Agentes reticulantes

A reticulação é o processo de ligação de cadeias poliméricas formando redes tridimensionais. A reticulação pode ser química, onde resulta da ligação covalente entre

as cadeias poliméricas (realizada por irradiação, vulcanização do enxofre ou reações químicas), ou física, onde envolve ligações não covalentes como interações iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Esta pode ainda ser intra ou intermolecular e é uma das técnicas primárias para modificação de polímeros, além do *grafting*, da formação de blendas e de compósitos (AZEREDO; WALDRON, 2016; BALAGUER et al., 2013; HENNINK; VAN NOSTRUM, 2012).

Esta técnica é especialmente útil para biopolímeros, pois estes apresentam alta sensibilidade à água, fazendo com que se desintegram quando em contato com esta ou que suas propriedades mecânicas e de barreira sejam prejudicadas devido ao inchamento e à absorção de água. A reticulação reduz a mobilidade da estrutura do polímero e geralmente aprimora suas propriedades de barreira e mecânicas, assim como sua resistência à água, reduzindo tanto a sua solubilidade em água quanto a absorção desta (BOANINI et al., 2010; DE CARVALHO; GROSSO, 2004; MENZEL et al., 2013; SEBTI; DELVES-BROUGHTON; COMA, 2003). As reações de reticulação também podem retardar a biodegradação de polissacarídeos e materiais proteicos, como foi reportado para a caseína por Picchio *et al.* (2018), para a PIS por Gonzáles *et al.* (2011), para a gelatina por Martucci & Ruseckaite (2009) e para a metil-celulose por Rimdusit *et al.* (2008) (PICCHIO et al., 2018a; GONZÁLES et al., 2011; MARTUCCI e RUSECKAITE, 2009; RIMDUSIT et al., 2008).

Os principais reticulantes utilizados em conjunto com proteínas são os aldeídos como o glutaraldeído, o formaldeído, o glioxal e o epóxi (MARQUIÉ, 2001; PARK et al., 2000; VAZ et al., 2005; BIGI et al., 2001). No entanto, estes componentes apresentam alta citotoxicidade, o que restringe o uso dos produtos que os utilizam, não sendo possível, por exemplo, utilizá-los para contato direto com alimentos (AZEREDO; WALDRON, 2016).

Compostos fenólicos são estruturas químicas formadas por um grupo hidroxila ligado a um anel aromático. Atualmente, existem mais de 8000 compostos fenólicos conhecidos contidos em frutas, vegetais e sementes. Estes podem ser classificados em dois grupos: compostos fenólicos básicos e polifenóis. Os polifenóis, que são ingeridos a partir dos alimentos, representam a principal fonte de antioxidantes para uso humano (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; GRAF; MILBURY; BLUMBERG, 2005). As principais classes destes são definidas de acordo com a natureza da sua cadeia carbônica podendo ser: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas. Os ácidos fenólicos incluem ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e os taninos hidrolisáveis (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

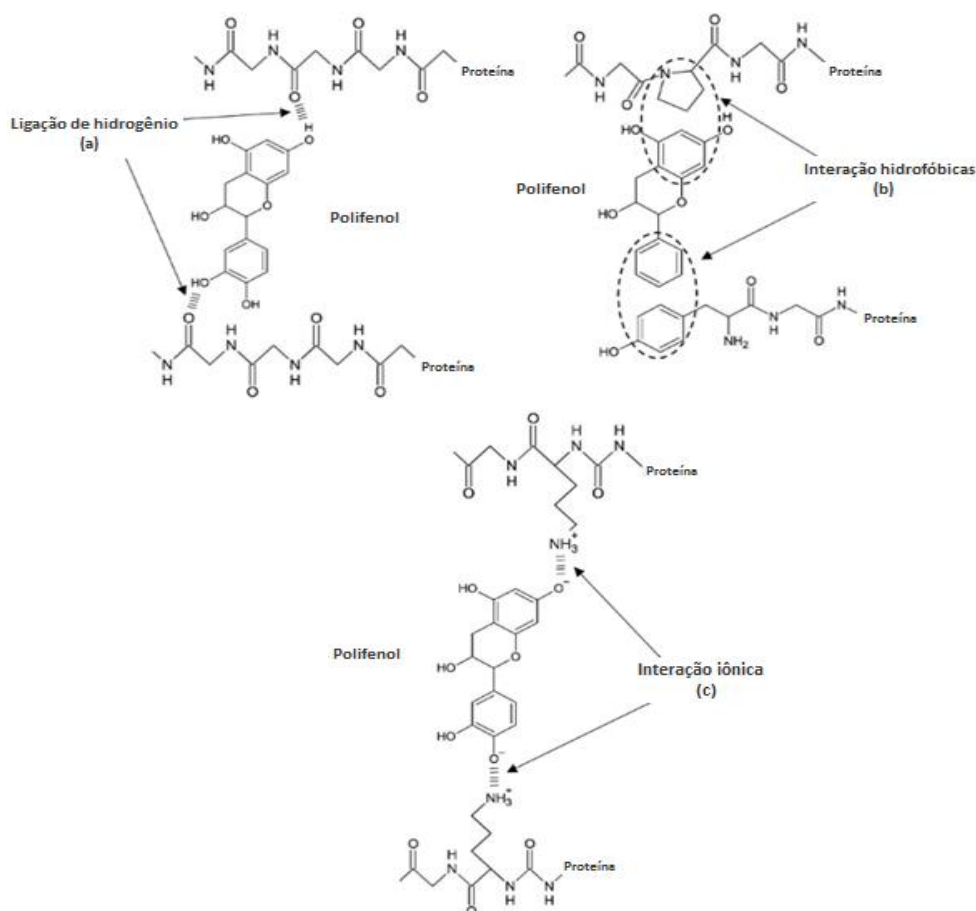
Proteínas e polifenóis são capazes de interagir por meio de ligações não covalentes (ligações hidrofóbicas, iônicas e de hidrogênio) ou covalentes. No entanto, os conjugados formados por ligações covalentes apresentam interações mais fortes e com maior estabilidade, o que as tornam permanentes (GU et al., 2017; LIU et al., 2017; YOU; LUO; WU, 2014). Interações não-covalentes entre proteínas e polifenóis são geralmente reversíveis e mais fracas que as ligações covalentes. As principais formas de ocorrência destas podem ser vistas na Figura 4.

De modo geral, as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas são as principais interações envolvidas na formação de conjugados de proteína-polifenóis. Os compostos fenólicos tem sido considerados excelentes doadores de hidrogênio, os quais podem

formar ligações com os grupos C=O da proteína. Além disto, as ligações de hidrogênio, que podem ser visualizadas no esquema da Figura 4a, também podem ser formadas por interações entre os grupos OH e moléculas de oxigênio e/ou nitrogênio do polifenol com os grupos hidroxila (-OH) e amino (-NH₂) da proteína (BUTIMEA-CANTÚA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2018; LE BOURVELLEC; RENARD, 2012; QUAN et al., 2019a).

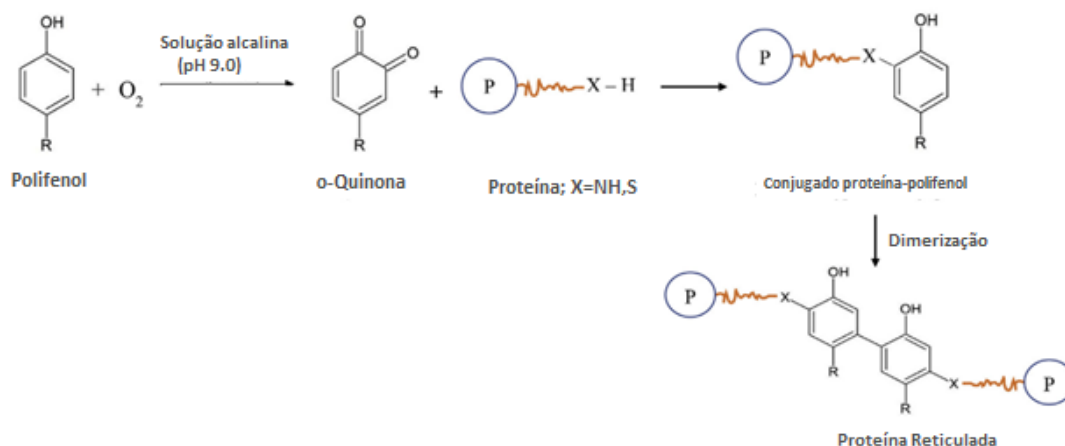
As interações hidrofóbicas, que podem ser visualizadas na Figura 4b, são formadas pela interação de aminoácidos hidrofóbicos residuais da proteína (leucina, isoleucina, glicina, metionina, alanina, fenilalanina, valina, tirosina, cisteína e triptofano) com os anéis aromáticos não-polares do polifenol (KANAKIS et al., 2011; OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). Outras interações como as ligações iônicas desempenham um papel menor na conjugação proteína-polifenol, nas quais a carga positiva dos grupos da proteína reagem com as cargas negativas dos grupos hidroxila dos polifenóis. O esquema deste tipo de ligação pode ser visualizado na Figura 4c (LE BOURVELLEC; RENARD, 2012; QUAN et al., 2019b). O esquema do principal método utilizado para a formação de ligações covalentes entre proteínas e polifenóis é demonstrado na Figura 5.

Figura 4 - Estruturas de ligações não-covalentes formadas por proteínas e polifenóis por reticulação via: a) ligação de hidrogênio, b) interação hidrofóbica e c) ligação iônica



Fonte Quan *et al* (2019)

Figura 5 - Esquema da interação covalente entre proteínas e polifenol a partir da reação de reticulação da proteína por meio de reações alcalinas.



Fonte Quan et al (2019)

Um dos principais métodos empregados para conjugar proteínas em polifenóis é a utilização de reações alcalinas. Nestas os polifenóis, que são propensos a oxidação (nestas condições e na presença de oxigênio) formam radicais semi-quinonas, os quais se rearranjam em quinonas. Estes produtos intermediários reativos facilmente reagem com os resíduos nucleofílicos da cadeia da proteína (metionina, lisina, triptofano e cisteína). Conseqüentemente, reticulações covalentes (C-N ou C-S) são formadas entre a cadeia de proteína e o polifenol (LIU et al., 2017; QUAN et al., 2019a; RAWEL; ROHN, 2002).

Ou *et al* (2005) estudaram os efeitos da adição de ácido ferúlico nas formas oxidada e não oxidada em filmes de PIS plastificados com glicerol (60% em massa de proteína). Os resultados demonstraram que uma concentração ótima de ácido ferúlico (100 mg/ 100 g) aumentou a resistência à tração, o percentual de alongamento na ruptura e a atividade antioxidante dos filmes para preservação de banha de porco fresca. Além disso, as propriedades do filme foram melhoradas quando o ácido ferúlico foi oxidado por peróxido de hidrogênio. Os autores sugeriram que os resultados obtidos ocorrem pelo aumento do grau de reticulação do filme devido à interação do ácido com os aminoácidos da proteína. Estes ressaltam que o comprimento de onda da absorbância para o filme de proteína e ácido ferúlico foi muito maior que para o ácido e proteína isoladamente. O deslocamento da absorbância indica a formação de uma ligação de reticulação entre o ácido ferúlico e a proteína, o que pode melhorar a vida útil dos alimentos embalados com este filme devido à diminuição da permeabilidade ao oxigênio (OU et al., 2005).

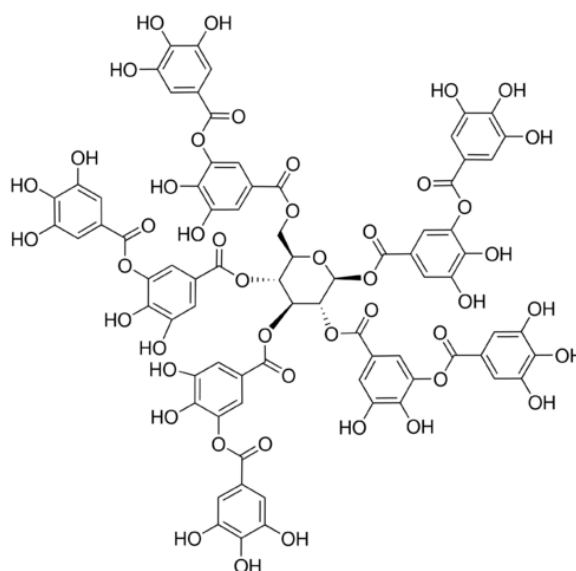
O efeito entre a interação de diferentes ácidos fenólicos com a proteína de soja foi estudado por Insaward et al (2015). Os ácidos ferúlico (FE), cafeico (AC) e gálico (AG), bem como seus produtos oxidados, foram utilizados neste estudo, sendo incorporados a solução formadora de filme de PIS (plastificado com 55% de glicerol) em teores de 0,5; 1 e 1,5% em m de PIS. Verificou-se que a adição dos ácidos fenólicos tem um efeito significativo nas propriedades mecânicas do filme, sendo que os filmes contendo AG exibiram a maior resistência à tração e alongamento na ruptura, seguidos por aqueles com adição de AC e FE, respectivamente. O estudo demonstrou que os ácidos fenólicos

oxidados produzem filmes com maiores resistência à tração e alongamento na ruptura do que seus equivalentes não oxidados. A adição de ácido fenólico também afetou a cor e a transparência do filme. Em comparação com o controle, amostras de filmes contendo fenólicos demonstraram redução na permeabilidade ao vapor de água e na solubilidade em água e aumento do ângulo de contato, especialmente em altas concentrações de adição de ácido fenólico oxidado (INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015).

3.5.1 Ácido Tânico

O ácido tânico ($C_{76}H_{52}O_{46}$) é um éster gálico de D-glicose, no qual os grupos hidroxila são totalmente esterificados com dímeros de ácido gálico. (Figura 6) É um tanino que pode hidrolisar sob condições ácidas ou alcalinas, produzindo carboidratos (glicose) e ácidos fenólicos (principalmente ácido gálico). O ácido tânico é um ingrediente importante no processo de curtimento de couro e também é usado como componente em algumas formulações de adesivo de madeira que substituem os adesivos de fenol-formaldeído. Sua capacidade de interagir fortemente com carboidratos e proteínas é usada para limpar vinhos, formando complexos insolúveis que sedimentam com proteínas. O ácido tânico tem propriedades antibacterianas, anti-enzimáticas e adstringentes e pode ser usado como medicamento contra diarreia, em formulações hemostáticas e anti-hemorroidas. Ainda no âmbito médico pode ser utilizado externamente no tratamento de úlceras na pele e feridas. Estudos recentes em animais mostraram que o ácido tânico exerce atividade quimio-preventiva do câncer (NOVAC; LISA; BALAITA, 2009).

Figura 6 - Estrutura química do ácido tânico.



Fonte Sigma-aldrich.

Rivero et al (2010) desenvolveram filmes de quitosana plastificados com glicerol e não plastificados ambos com adição de ácido tânico. A capacidade de reticulação do ácido tânico foi estudada avaliando a modificação estrutural produzida nos filmes de quitosana e seu efeito nas propriedades físico-químicas, de barreira e mecânicas. Formulações contendo ácido tânico aumentaram 29% da resistência à tração, enquanto diminuíram

24% da permeabilidade ao vapor de água. A solubilidade do filme diminuiu quando produzido a 100°C, confirmando que a exposição a altas temperaturas facilita o processo de reticulação. A presença de ácido tânico e glicerol em conjunto mostrou um efeito sinérgico nas propriedades estudadas, as quais apresentaram comportamento intermediário em relação às determinadas com a adição de ácido ou plastificante (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010b).

Picchio et al (2018) avaliaram o efeito do uso de ácido tânico como agente reticulante em filmes de caseína plastificada com glicerol, os teores avaliados foram 4, 8, 10, 15 e 20% de ácido tânico (AT) em uma solução contendo 10% em massa de proteína. As técnicas de FTIR, RMN de alta resolução e medidas reológicas confirmaram a reação de reticulação entre os grupos amina da caseína e o ácido tânico. Os autores investigaram ainda a influência da concentração do agente de reticulação nas propriedades mecânicas e viscoelásticas, estabilidade térmica, comportamento de intumescimento, permeabilidade ao vapor de água, citotoxicidade e degradação nas condições de compostagem. Os resultados demonstraram que os filmes reticulados apresentaram uma estrutura de rede, que foi modificada notavelmente pela concentração de ácido fenólico usada na reação de reticulação. Comparados aos filmes não tratados, os valores de resistência à tração dos materiais reticulados aumentaram significativamente, mas o alongamento na ruptura foi reduzido. O uso de AT como reticulante também melhorou a resistência à água dos filmes. A influência do tempo de armazenamento sobre a resistência à água dos filmes também foi investigada, constatando que, após um longo período de tempo, o grau de intumescimento no equilíbrio foi significativamente reduzido. A estabilidade térmica dos filmes foi melhorada pela reticulação com ácido tânico. A análise de citotoxicidade mostrou que os filmes podem ser considerados não tóxicos, embora o AT não reagido possa ser uma fonte de toxicidade em altas concentrações. De acordo com os dados dos ensaios de biodegradação, os filmes podem ser facilmente decompostos após 7 dias em condições de compostagem, e sua taxa de degradação pode ser controlada pela concentração de AT, devido à sua atividade antibacteriana (PICCHIO et al., 2018a).

4 Materiais e Métodos

Neste capítulo serão descritos todos os materiais utilizados, bem como a metodologia utilizada para o desenvolvimento deste estudo.

4.1 Materiais

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, sem nenhuma alteração. Utilizou-se a proteína isolada de soja (PIS) como matriz polimérica (teor de proteína entre 88-92%, Bremil S.A., Brasil) esta foi disponibilizada pela empresa Bremil S.A..

O Glicerol (PM: 92,10, Dinâmica, Brasil) foi utilizado como plastificante, este foi escolhido por ser um composto polar, apresentando três hidroxilas em sua estrutura química, e por apresentar um tamanho de cadeia menor que outros pólios também polares, o que facilita a interação com a cadeia da proteína e possibilita uma maior elevação da alongação com menor redução da tensão na ruptura como demonstrado por Mo e Sun (2002).

A água destilada e álcool etílico 95% P.A. (Neon, Brasil) foram utilizados como solventes, sendo o álcool utilizado para solubilizar os óleos utilizados na Etapa II. Os óleos de coco virgem (Copra, Brasil) e de linhaça marrom extra virgem (Pazze, Brasil) foram utilizados, por possuírem ácidos graxos em sua composição que apresentam um comportamento altamente hidrofóbico, sugerindo que estes possam elevar a hidrofobicidade dos filmes obtidos. Foram avaliados ambos os óleos por apresentarem ácidos graxos diferentes em sua composição, sendo o OC composto principalmente por ácidos saturados e o OL ácidos insaturados.

O ácido tânico (teor de polifenóis maior de 68%, Êxodo Científica, Brasil) foi utilizado como agente reticulante, devido a forte presença de moléculas de ácido gálico esterificadas presentes em sua estrutura o que sugere que este possa formar ligações cruzadas com a cadeia da proteína quando em meio alcalino.

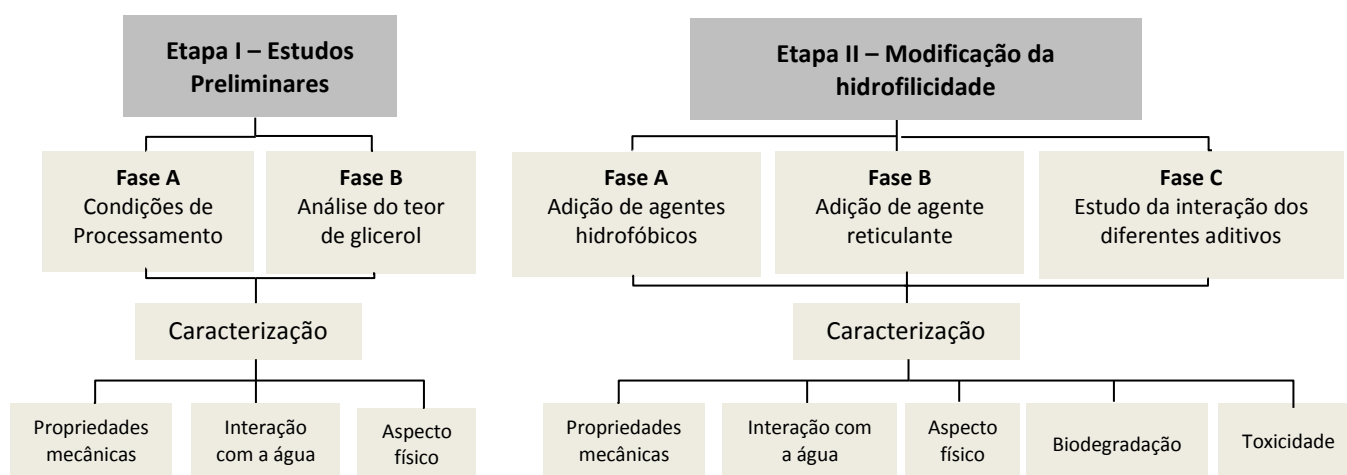
4.2 Metodologia

A metodologia empregada neste trabalho foi dividida em 2 etapas, conforme o fluxograma da Figura 7. Na primeira etapa foram realizados estudos preliminares para desenvolver a metodologia de produção dos filmes que seria empregada na Etapa II e avaliar o uso do plastificante, esta foi dividida em dois estudos. O primeiro estudo foi voltado para a verificação dos parâmetros adequados de produção do filme, contemplando os dois objetivos específicos iniciais deste trabalho, avaliar o efeito dos parâmetros de processamento e desenvolver a metodologia de produção dos filmes. Com a metodologia desenvolvida foi realizado o segundo estudo da etapa preliminar onde se buscou avaliar a influencia do teor de plastificante glicerol e definir o teor ótimo que será utilizado na Etapa II, atingindo o terceiro e o quarto objetivos específicos deste trabalho.

Na segunda etapa, buscou-se avaliar diferentes aditivos para modificação das propriedades de hidrofobicidade do filme. Para isto, esta foi dividida em três diferentes fases relacionadas ao quinto, sexto e sétimo objetivos específicos deste trabalho. Na primeira fase da Etapa II avaliou-se o uso de dois agentes hidrofóbicos (óleo de coco e de

linhaça) como estratégia para redução da hidrofiliicidade dos filmes. Na segunda fase avaliou-se a utilização de um agente reticulante (ácido tânico), como segunda estratégia para a redução da hidrofiliicidade. Na terceira fase avaliou-se a interação entre os óleos e o agente reticulante. Por fim, contemplando o sétimo objetivo específico deste trabalho, avaliou-se a toxicidade e a biodegradabilidade dos filmes obtidos na terceira fase da segunda etapa.

Figura 7 – Fluxograma das etapas de pesquisa realizadas



Nas Figuras 8 e 9 está apresentado o detalhamento do estudo na Etapa I e II, respectivamente. Nestes fluxogramas é possível verificar as condições e teores que foram estudados em cada fase de cada etapa.

Figura 8 – Fluxograma detalhado da realização da Etapa I

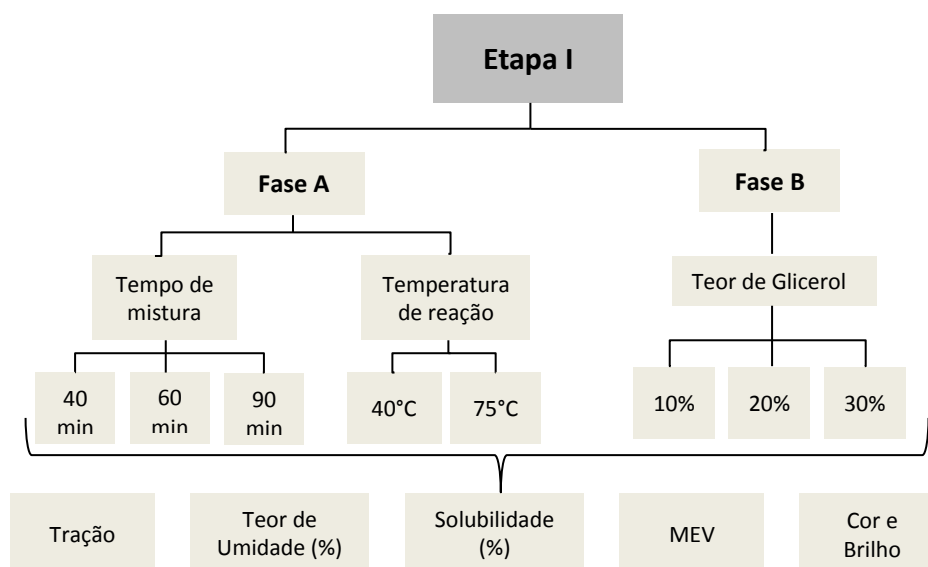
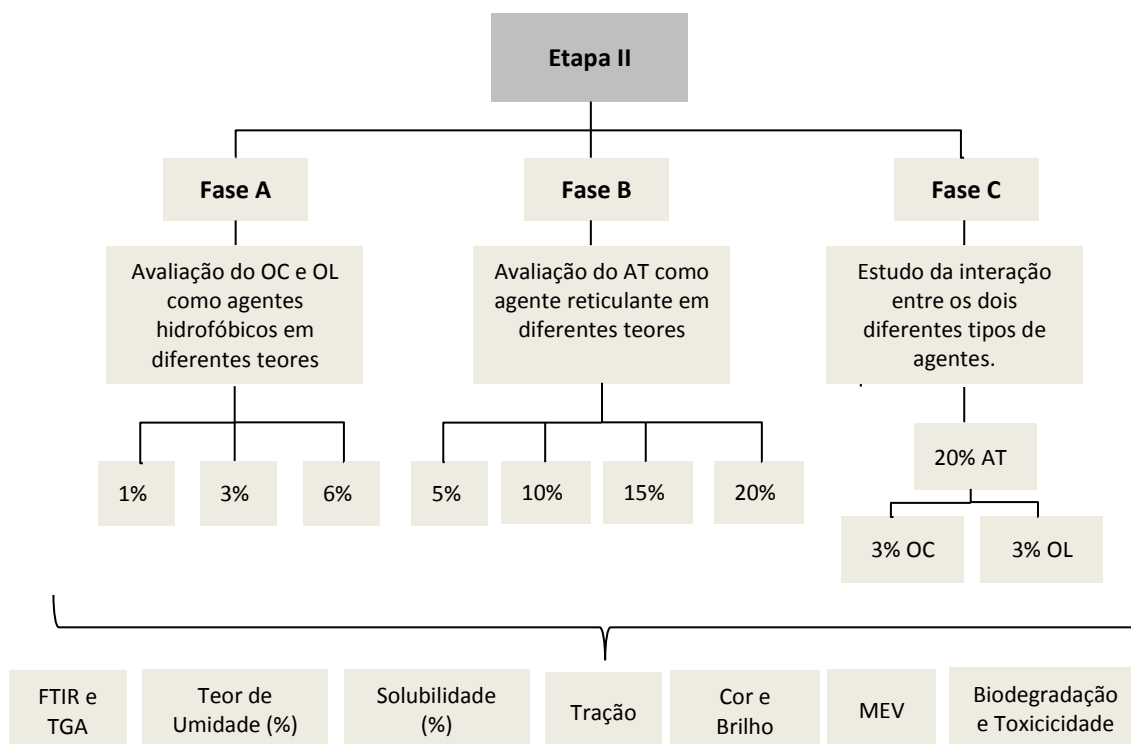


Figura 9 - Fluxograma detalhado da realização da Etapa II



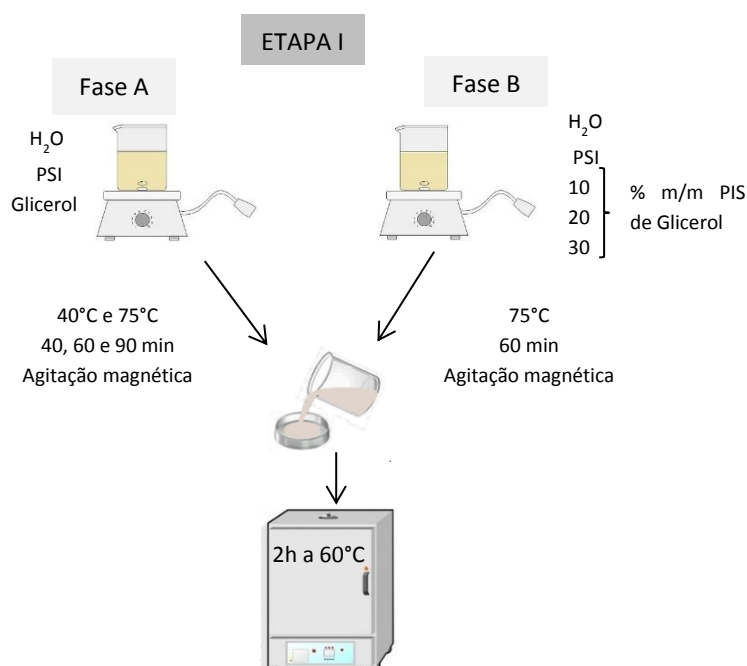
4.3 Preparo dos filmes

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias de preparo dos filmes utilizados neste estudo na Etapa I e Etapa II. Os filmes de proteína de soja isolada foram produzidos pelo método de *casting*.

4.3.1 Etapa I

A etapa I foi dividida em duas fases, em ambas o filme foi produzido pelo processo de *casting*, onde a solução formadora do filme foi preparada dissolvendo-se a PIS e o plastificante em água destilada sob agitação magnética, em velocidade média, e em pH 9 obtido com a utilização de uma solução 2M de NaOH. Após o tempo de reação a solução foi despejada em uma placa de poliestireno e colocada em estufa para evaporação dos solventes, sendo deixada nesta por 2h a 60°C. Uma representação esquemática deste processo pode ser visualizada na Figura 10. Na etapa I-A, foram estudadas duas condições de temperatura (40°C e 75°C) e três diferentes tempos de agitação (40, 60 e 90 minutos) para definir as melhores condições de processamento. O teor de plastificante utilizado nesta etapa foi definido como 20% de glicerol em massa de proteína por ser um teor médio encontrados na literatura.

Figura 10 - Esquema de produção das amostras da Etapa I.



Na etapa I-B, as condições de processamento utilizadas foram as definidas na etapa anterior, nesta fase foram estudados os teores de 10, 20 e 30% de glicerol em massa de PIS para verificar o efeito do teor de plastificante nas propriedades do filme. Na Tabela 4 estão resumidas as composições utilizadas para desenvolvimento dos filmes, assim como as condições de processamento.

Tabela 4 – Composição e condições de processamento dos filmes avaliados

Etapa	Filme*	Matriz polimérica (% m/m de solução formadora)	Plastificante (% m/m de PIS)	Temperatura (°C)	Tempo de mistura (min)
		PIS	Glicerol		
Etapa I-A	PG-4040	6,5	20	40	40
	PG-4060			40	60
	PG-4090			40	90
	PG-7540			75	40
	PG-7560			75	60
	PG-7590			75	90
Etapa I-B	PIS-G10	7,5	10	75	60
	PIS-G20	6,5	20	75	60
	PIS-G30	5,8	30	75	60

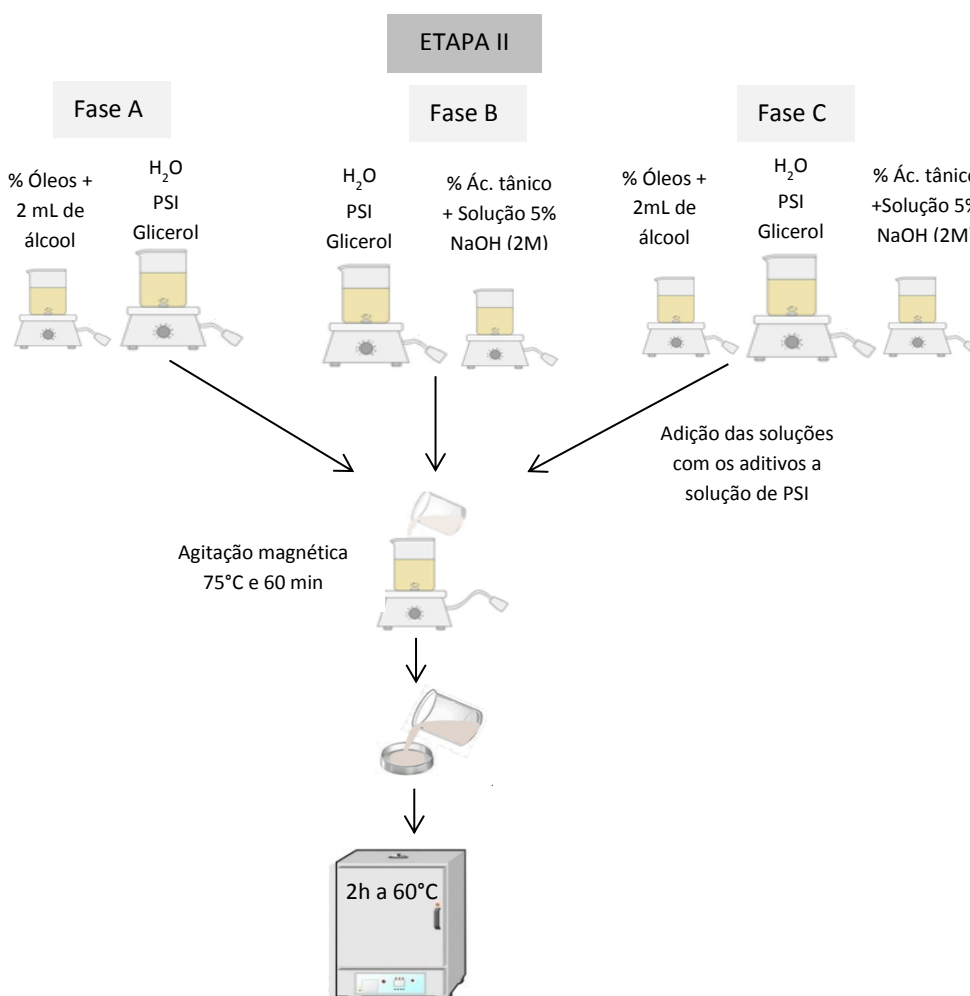
*Filmes de PIS (P), Glicerol (G) e a amostra controle está referida com (C). Na Etapa I-A o primeiro número refere-se à temperatura de processamento e o segundo ao tempo de mistura. Na etapa I-B o número refere-se ao teor de glicerol.

4.3.2 Etapa II

Na Etapa II os filmes também foram produzidos pelo método de *casting*, sendo a solução formadora de filme produzida com a solubilização da PIS, do plastificante glicerol (no teor de 20% m/m de PIS, conforme definido na etapa I-B) além dos aditivos estudados em água destilada e pH 9 (obtido com solução de NaOH 2M). Para a adição dos aditivos, realizou-se um pré-preparo destes, sendo a solubilização por 10 min dos agentes hidrofóbicos em álcool etílico e do ácido tânico em uma solução contendo 5% em volume de solução 2M de NaOH.

Em todas as fases desta etapa utilizaram-se como condições de reação o tempo de 60 minutos de mistura e $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Após a homogeneização da solução esta foi despejada em uma placa de poliestireno e colocada em estufa por 2h a 60°C para que ocorresse a evaporação dos solventes. O processo de produção dos filmes pode ser visualizado no esquema apresentado na Figura 11.

Figura 11- Esquema de produção das amostras da Etapa II.



Na etapa II-A foram avaliados diferentes teores de OC e de OL, na etapa II-B foi estudada a adição de vários teores de AT, já na etapa II-C estudou-se a mistura do OC e do OL com o AT nos teores definidos nas etapas anteriores. A composição dos filmes utilizados na etapa II pode ser conferida na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição dos filmes avaliados

Etapa	Filme*	Matriz polimérica (% m/m de solução formadora)	Aditivos (%m/m de PIS)			
		PIS	Glicerol	OC	OL	AT
Etapa II-A	PG-C	6,5	20	0	0	0
	PG-1OC	6,7	20	0,8	0	0
	PG-3OC	6,7	20	3,2	0	0
	PG-6OC	6,6	20	5,6	0	0
	PG-1OL	6,7	20	0	0,8	0
	PG-3OL	6,7	20	0	3,2	0
	PG-6OL	6,6	20	0	5,6	0
Etapa II-B	PG-C	6,5	20	0	0	0
	PG-5AT	6,6	20	0	0	5
	PG-10AT	6,6	20	0	0	10
	PG-15AT	6,6	20	0	0	15
	PG-20AT	6,6	20	0	0	20
Etapa II-C	PG-OCAT	6,6	20	3,2	0	20
	PG-OLAT	6,6	20	0	3,2	2

*Filmes de PIS (P), Glicerol (G) e a amostra controle está referida com (C). Na Etapa I-A o primeiro número refere-se à temperatura de processamento e o segundo ao tempo de mistura. Na etapa I-B o número refere-se ao teor de glicerol. Nas Etapas II A, B e C as letras referem-se aos aditivos: óleo de coco (OC), óleo de linhaça (OL) e ácido tânico (AT) e o número ao teor do aditivo na formulação.

4.4 Caracterização dos filmes obtidos

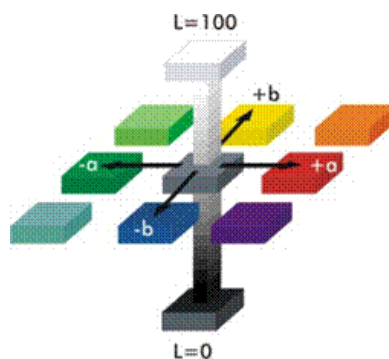
4.4.1 Propriedades avaliadas em todas as etapas

Análise colorimétrica e óptica

As análises de cor e brilho foram realizadas com o uso de um espectrofotômetro portátil Spectro-Guide, da marca BYK, modelo Sphere Gloss, disponível no LAPOL. Foi adotado o sistema de cores CIELAB, da Comissão Internacional de Iluminação. As medidas foram realizadas aleatoriamente em cinco diferentes pontos da face exposta do filme.

Com a análise obtiveram-se os valores de a, b e L. Esses valores compõem as variáveis do espaço cromático CIELab (Figura 12) e auxiliam na quantificação das variações de coloração apresentado pelas amostras. O valor “a” mostra a variação da coloração verde (-a) para o vermelho (+a); o valor “b” está relacionado com as mudanças da coloração de azul (-b) para o amarelo (+b) e o valor “L” representa a luminosidade, sendo que seus valores numéricos variam de preto (0) para branco (100). Além dos parâmetros de cor, se obtém os valores de opacidade e brilho das amostras.

Figura 12 - Representação do espaço cromático CIELab de cores.



Absorção de umidade

A determinação da absorção de umidade dos filmes foi realizada com base na norma ASTM D 5229. As amostras, de 2x3 cm, foram armazenadas em dessecador com sílica por 48h, para retirada de umidade superficial excedente. Estas foram pesadas e então colocadas em recipientes fechados mantidos com umidade controlada. Para o controle da umidade do meio onde as amostras foram mantidas foi empregada uma solução salina de NaCl, segundo a metodologia da norma ASTM E 104-02, mantendo um ambiente isolado com uma atmosfera de umidade próxima a 75% UR, sendo a temperatura média de ensaio de 30°C, visto que estas foram mantidas em estufa. Após 24h as amostras foram pesadas em uma balança analítica (Shimadzu, modelo AY 220, Japão) com precisão de 0,0001 g, a diferença de massa foi atribuída à umidade absorvida pela amostra.

Solubilidade

O ensaio de solubilidade foi realizada com base no método proposto por FAKHOURI et al., (2013). Foram utilizadas amostras de 2x3 cm, estas foram previamente armazenadas em dessecador com sílica por 48h, para retirada de umidade superficial excedente. As amostras foram pesadas para determinação de sua massa inicial, imersas em 50 mL de água destilada e agitadas por 24h a 30°C. Após o tempo de ensaio as amostras foram retiradas da água, secas por 1h em estufa a 60°C e após, armazenadas por 24h em dessecador com sílica para retirada da umidade superficial excedente. Após secas as amostras foram pesadas novamente. A variação de massa obtida, em percentual, correspondeu à solubilidade do filme.

Ensaio mecânico de tração

As propriedades mecânicas de alongamento e tensão na ruptura dos filmes foram determinadas por meio do ensaio de tensão sob tração de acordo com a ASTM D882-2012. Para cada filme, no mínimo sete corpos de prova retangulares de 80 x 25 mm foram utilizados. Estes foram previamente armazenados em dessecador com sílica por 48 h, para retirada de umidade superficial excedente, após estes foram mantidos por no mínimo 10 minutos em ambiente com 50% de umidade relativa na qual o ensaio seria realizado, para minimizar o efeito da umidade nos resultados de tração. Os corpos de

prova foram ensaiados em um equipamento de testes universais (INSTRON, Modelo 3367, EUA) sendo submetidos a uma distância entre garras de 20 mm e taxa de separação de 10 mm.min⁻¹ com célula de carga com capacidade de 50 N. Os ensaios foram realizados no Instituto Federal Sul-rio-grandense.

4.4.2 *Caracterização da superfície dos filmes – Etapa I-A*

Microscopia de Superfície

A morfologia da superfície dos filmes obtidos na Etapa I-A foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM 6010 LA). Esta análise foi realizada nesta etapa devido ao visível aparecimento de rugosidade nas amostras produzidas em diferentes condições de processamento. As amostras foram fixadas em suportes com fita de cobre e metalizadas por uma fina camada de ouro (Denton Vacuum, Desk V). As imagens foram capturadas usando voltagem de aceleração de 5 kV. A caracterização foi realizada no ISI Polímeros.

4.4.3 *Caracterização química e térmica – Etapa II*

A caracterização química e térmica das amostras foi realizada apenas na Etapa II, para verificar o efeito das modificações ocorridas com a adição dos aditivos estudados neste trabalho.

FTIR- ATR

A análise de FTIR-ATR foi realizada em um Espectrômetro da marca Perkin Elmer modelo Spectrum 1000. Foram feitas 32 leituras com resolução de 4 cm⁻¹, por transmitância em intervalo de 4000 - 600 cm⁻¹. Com esta buscou-se verificar as interações que ocorreram entre a cadeia da proteína e os aditivos adicionados neste trabalho.

Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) permite avaliar a perda de massa que ocorre em uma amostra, quando submetida a uma variação de temperatura, durante um período de tempo, permitindo avaliar as interações entre a cadeia da PIS e dos aditivos estudados por meio do estudo da degradação térmica dos filmes. As análises foram realizadas utilizando-se uma balança termogravimétrica modelo Q50, da marca TA Instruments, usando atmosfera de nitrogênio com fluxo de 90 mL/min. Amostras de 15 mg foram submetidas a uma rampa de aquecimento da temperatura ambiente até 950 °C, usando uma taxa de aquecimento de 10° C/min. Para análise dos dados foi utilizado o software TA Universal Analysis.

4.4.4 Análises Complementares – Etapa II-C

Microscopia da superfície e superfície de fratura

A morfologia da superfície dos filmes e a da superfície de fratura dos mesmos foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM 6010 LA). As amostras foram fixadas em suportes com fita de cobre e metalizadas por uma fina camada de ouro (Denton Vacuum, Desk V). As amostras de superfície de fratura foram fraturadas em presença de nitrogênio líquido. As imagens foram capturadas usando voltagem de aceleração de 5 kV. A caracterização foi realizada no ISI Polímeros.

Biodegradação

O ensaio de biodegradação foi realizado segundo a norma ASTM G 160 – 03, onde amostras quadradas de 5 cm de lado foram pesadas e registradas fotograficamente e em seguida enterradas e mantidas nesta condição por 7, 14, 21 e 28 dias. Após o tempo de ensaio foi avaliada a modificação no aspecto visual das amostras para avaliar a ocorrência de degradação e estas foram limpas, secas e pesadas para avaliar a perda de massa sofrida. O ensaio foi realizado em triplicata e o solo utilizado foi um solo compostado adquirido comercialmente.

Para controle do meio onde as amostras estiveram expostas foram acompanhadas a temperatura e a umidade relativa do ar nos dias de realização do ensaio, na cidade de Porto Alegre, no bairro Agronomia (Latitude 30° 05'S, Longitude 51° 11'W) a partir de dados obtidos do site governamental INMET. Estes dados podem ser visualizados nas Figuras 13 e 14. Foram também acompanhadas a umidade do solo, apresentada na Figura 44, e o pH deste, que variou entre 6,6 e 6,8 no período.

Figura 13 – Variação da temperatura ambiente da cidade de Porto Alegre no período estudado

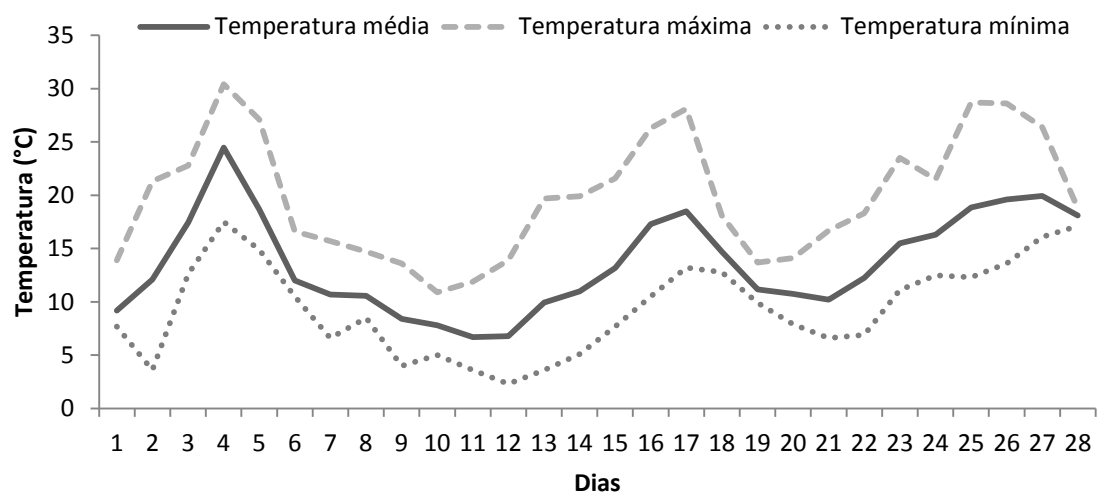
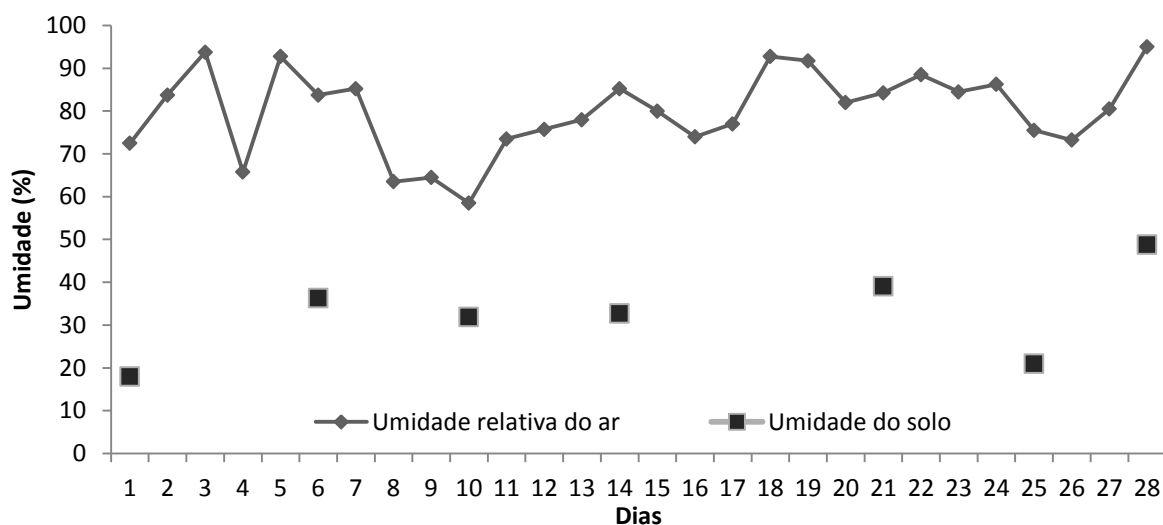


Figura 14 – Variação da umidade relativa do ar da cidade de Porto Alegre e da umidade do solo no período estudado



Toxicidade

A análise de toxicidade foi realizada segundo adaptações no método proposto por Fiskesjö (1985). Cebolas da espécie *Allium Cepa* foram colocadas em contato com soluções contendo cerca 0,03 g dos filmes avaliados (retângulo de 3x2 cm) e 50 mL de água. O crescimento das plantas e das raízes foi acompanhado para avaliar a influencia dos componentes dos filmes no crescimento destas. O ensaio foi realizado com três amostras para cada filme estudado e realizado em triplicata.

4.5 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em no mínimo triplicata e a ANOVA de fator único e o teste de Tukey foram usados para verificar diferenças estatísticas entre os grupos com 95% de confiança. As análises de variância foram realizadas utilizando o software comercial *Minitab 17 Statistical Software*.

5 Resultados e Discussão

Este capítulo será dividido em duas partes, na primeira estarão contidos os resultados da Etapa I, onde são avaliadas as condições preliminares para definição das condições de processamento e do teor de plastificante que será utilizado nas etapas posteriores de modificação. Na segunda parte estarão contidos os resultados da Etapa II, onde serão avaliados os aditivos para modificação da hidrofobicidade propostos neste estudo assim como a interação destes nas condições ótimas apontadas neste estudo.

5.1 Etapa I

Na Etapa I foram realizados estudos preliminares para avaliar as condições de preparo mais adequadas dos filmes a base de PIS. Foram avaliadas as características do processo, como temperatura e tempo de mistura, e o efeito do teor do plastificante glicerol adicionado. Uma vez conhecida a influência destas variáveis, foi possível atribuir as possíveis modificações nas propriedades funcionais dos filmes somente à adição dos óleos e do agente reticulante.

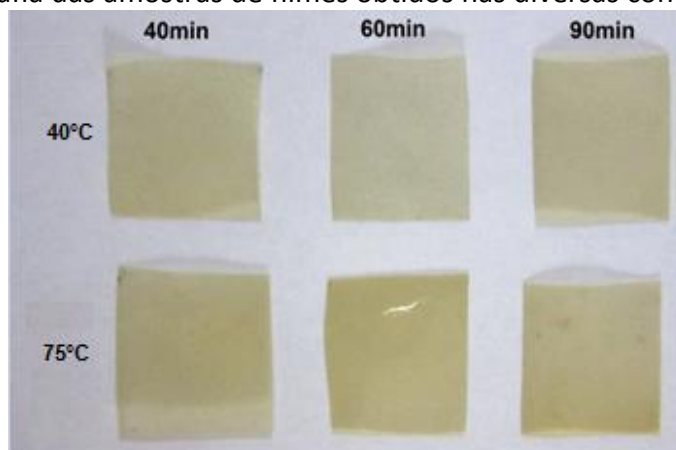
5.1.1 Fase A- Estudo das condições de processamento

Na Etapa I-A buscou-se estudar a influência dos parâmetros do processo, temperatura e tempo de mistura, nas propriedades dos filmes produzidos e, para isto, foram avaliadas as características visuais e morfológicas dos filmes, as propriedades de interação destes com a água (como a solubilidade e teor de umidade absorvido) e as propriedades mecânicas destes por meio do ensaio de resistência a tração.

Características visuais e microestrutura

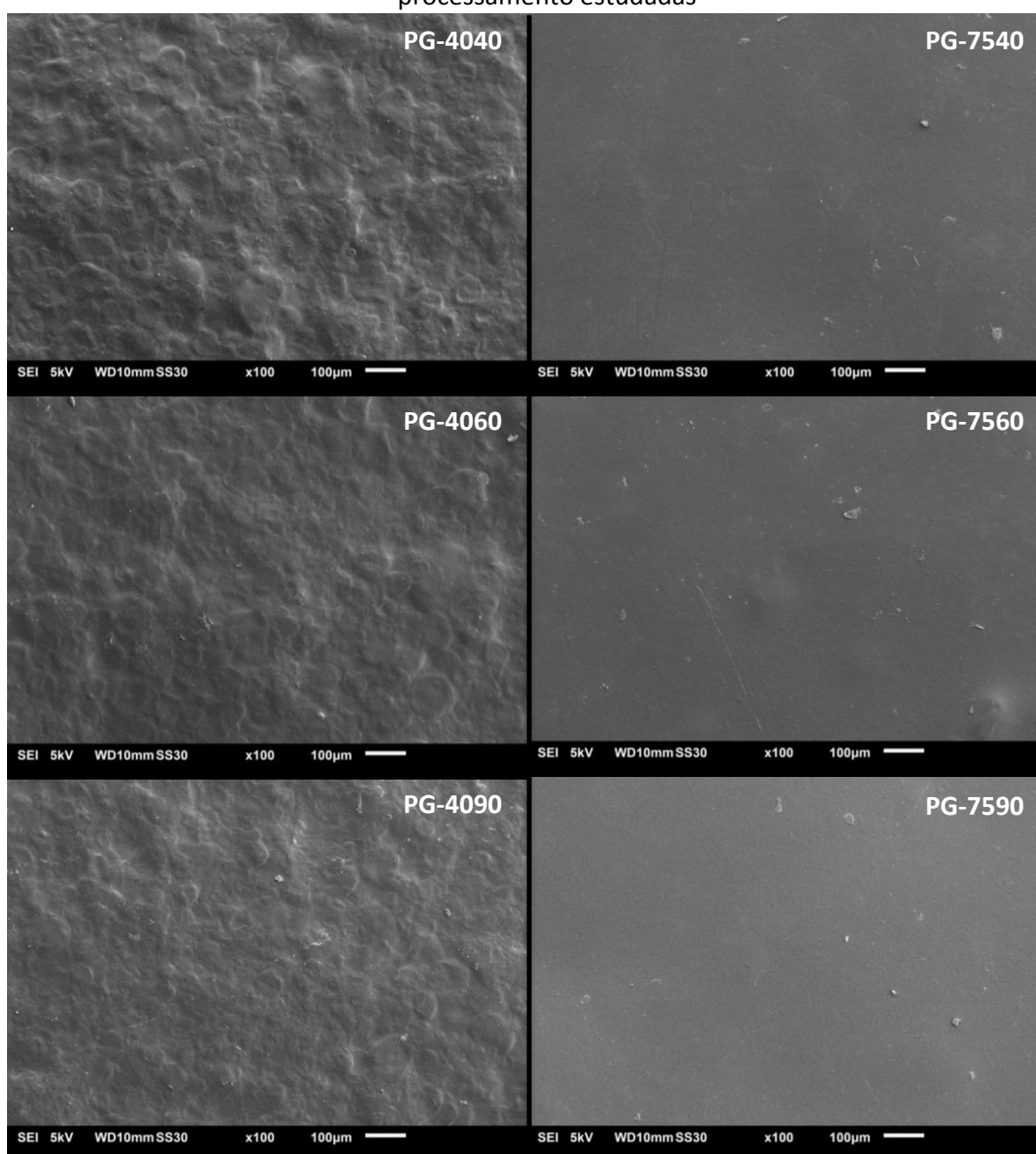
O aspecto dos filmes é de extrema relevância quando estes são direcionados ao setor de embalagens, visto que esta, além de ter função de proteção, possui a função de passar as informações aos consumidores além de possuir apelo comercial. Desta forma, busca-se obter filmes lisos, com brilho e transparência possibilitando a obtenção de embalagens mais bonitas e atrativas para chamar a atenção dos consumidores. (DEGRUSON, 2016) Os filmes produzidos nas condições estudadas podem ser vistos na Figura 15, onde é possível verificar sua coloração levemente amarelada e sua aparência homogênea.

Figura 15 - Fotografia das amostras de filmes obtidos nas diversas condições avaliadas



Qualitativamente observa-se que os filmes apresentaram coloração e opacidade semelhantes e ao toque foi possível perceber diferenças na rugosidade destes. Este último efeito foi confirmado com a análise morfológica da superfície destes filmes, como pode ser visualizado nas micrografias obtidas por MEV na Figura 16. Nesta verifica-se que as amostras produzidas a 40°C apresentam rugosidade significativamente maior do que as produzidas a 75°C. Além disto, observa-se que para as amostras obtidas a 40°C o aumento do tempo de mistura reduz um pouco esta rugosidade. As micrografias foram realizadas na superfície que esteve em contato com a placa para minimizar os efeitos da evaporação, ocorrida no processo de formação de filmes por *casting*, na formação de rugosidade.

Figura 16 - Micrografias da superfície dos filmes produzidos nas diferentes condições de processamento estudadas



*Na primeira coluna encontram-se as imagens referentes aos filmes produzidos a 40°C e 40, 60 e 90 minutos de processamento, respectivamente. Já na segunda coluna estão apresentados os filmes produzidos a 75°C seguindo a mesma ordem de tempos de processamento que a primeira coluna.

Estes resultados indicam que o aumento da temperatura facilita a desnaturação das moléculas da proteína. Stuchell e Krochta (1994) obtiveram resultados semelhantes comparando filmes de proteína de soja obtidos sem aquecimento e a 85°C pelo método de *casting*. Os autores sugeriram que a rugosidade apresentada pelos filmes sem tratamento térmico demonstrou que uma parte da proteína permaneceu em seu estado nativo e que a temperatura promoveu maior grau de desnaturação o que permitiu o aumento das interações e da compactação entre as cadeias da proteína (STUCHELL; KROCHTA, 1994). Na literatura encontram-se diversos trabalhos mais recentes utilizando temperaturas entre 70 e 80°C, como Carpiné *et al.* (2015), Galus *et al.* (2018), González *et al.* (2019) e Adilah e Hanani (2019)(CARPINÉ *et al.*, 2015; GALUS, 2018; GONZÁLEZ *et al.*, 2019; MARYAM ADILAH; NUR HANANI, 2019). Como estes autores obtiveram bom desempenho na produção dos filmes optou-se, neste estudo, avaliar a temperatura de 75°C para produção dos filmes.

Pode-se verificar também que para as amostras produzidas a 40°C ocorreu uma pequena redução da rugosidade com a elevação do tempo de agitação. Carpiné *et al.* (2015), que também avaliou o efeito da agitação sobre a microestrutura de filmes a base de PIS, observou este mesmo efeito que foi atribuído a presença de partículas não solubilizadas em menores intensidades de agitação (CARPINÉ, 2015).

Para melhor avaliar a influencia do processamento sobre a coloração e sobre propriedades óticas das amostras realizou-se a análise colorimétrica dos filmes. Os resultados numéricos desta análise são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Propriedades óticas e de cor das amostras da Etapa I-A

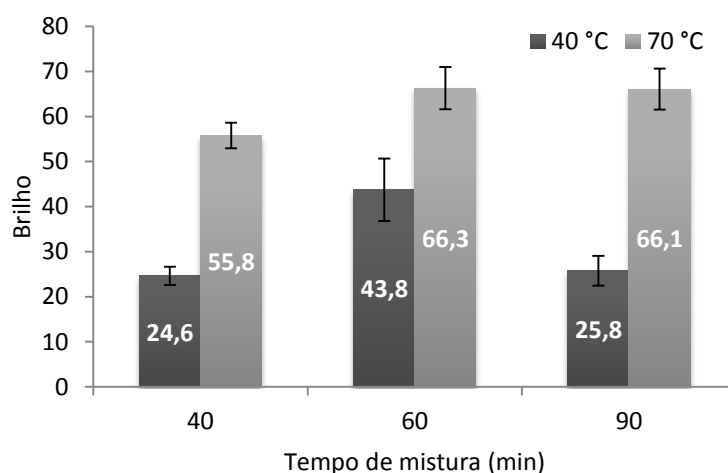
Filme*	L	A	b	Opacidade	Brilho
PG-4040	87,4 ± 0,56 ^{ab}	-1,64 ± 0,07 ^b	13,9 ± 1,20 ^a	21,7 ± 0,02 ^{ab}	24,6 ± 2,04 ^c
PG-4060	86,8 ± 0,88 ^{ab}	-1,79 ± 0,02 ^b	15,1 ± 0,92 ^a	22,9 ± 0,99 ^{ab}	35,6 ± 1,19 ^b
PG-4090	87,6 ± 0,53 ^{ab}	-1,70 ± 0,15 ^b	13,6 ± 0,99 ^a	21,6 ± 0,60 ^{ab}	25,8 ± 3,29 ^c
PG-7540	88,5 ± 0,16 ^a	-1,49 ± 0,04 ^b	12,1 ± 0,30 ^a	20,4 ± 0,34 ^b	55,8 ± 2,84 ^a
PG-7560	85,6 ± 1,16 ^b	-1,70 ± 0,14 ^b	15,0 ± 0,97 ^a	25,8 ± 1,43 ^a	64,2 ± 0,81 ^a
PG-7590	87,2 ± 0,61 ^{ab}	-1,15 ± 0,06 ^a	13,7 ± 1,43 ^a	22,3 ± 1,11 ^{ab}	66,1 ± 4,56 ^a

*Todas as formulações contêm: Proteína Isolada de soja (PIS): 6,5% (m/m); Glicerol (G): 80:20 (% PIS:G).

Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey (p < 0,05), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Observa-se que, com os dados apresentados, não foi possível estabelecer uma correlação entre a variação da temperatura e do tempo de mistura com a variação dos parâmetros de cor e com a opacidade, sendo que as variações apresentadas nestas podem ser atribuídas às variações de espessuras apresentadas pelas amostras, que são típicas do processo de *casting*, sendo que estas ficaram na faixa de 70 a 100 µm. No entanto, é possível verificar que um aumento de temperatura provocou uma elevação significativa no brilho das amostras. Este efeito pode ser observado na Figura 17, onde o resultado da análise de brilho é apresentado graficamente, assim como na Figura 15.

Figura 17 - Resultados de brilho para as amostras avaliadas



Stuchell e Krochta (1994) observaram um efeito semelhante em seu estudo avaliando o efeito da temperatura no brilho dos filmes obtidos. Estes associaram o maior brilho apresentado pelo filme que passou por tratamento térmico à desnaturação da proteína ocorrida nesta condição permitindo maior interação e maior empacotamento das cadeias desta (STUCHELL; KROCHTA, 1994).

Sendo a desnaturação térmica maior nas amostras obtidas a 70°C, e assim possibilitando a obtenção de uma superfície mais lisa e homogênea, foi possível obter um aumento significativo também do brilho apresentado pelas amostras. Segundo Guerrini *et al.* (2004) o brilho é um fenômeno reflexivo medido num ângulo pré-determinado e, em geral, quanto mais lisa a superfície de um filme, maior o brilho desta, pois esta propriedade é função da rugosidade superficial, que dependerá das condições de processo e das propriedades reológicas do material (GUERRINI *et al.*, 2004).

Propriedades de interação com a água

A interação com a água é uma das principais propriedades que devem ser consideradas quando se produz filmes para embalagens alimentícias, visto que esta pode alterar a qualidade dos alimentos embalados. Sendo a proteína de soja um material higroscópico, se faz necessário avaliar o teor de umidade contido pelos filmes e a solubilidade destes para conhecer sua estabilidade quando em contato com a água. Desta forma, busca-se uma condição que possibilite a obtenção de filmes com menor solubilidade e absorção de umidade (KROCHTA *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2011).

Sendo assim, foram realizados os ensaios de solubilidade e de teor de umidade, os quais têm seus resultados apresentados na Tabela 7. É possível avaliar que um aumento na temperatura possibilitou a redução de 23% na absorção de umidade e de 38% da solubilidade, para o filme produzido no menor tempo de mistura. Os filmes produzidos a 40°C se romperam após 24h submersos a 30°C, o que influenciou o alto erro experimental obtido para estas amostras no ensaio de solubilidade.

Tabela 7 – Resumo das propriedades de interação com a água

<i>Filme</i>	<i>Solubilidade 24h a 30°C (%)</i>	<i>Teor de umidade em 24h em 75% UR (%)</i>
PG-4040	69,9 ± 7,51 ^a	18,37 ± 1,09 ^a
PG-4060	52,7 ± 6,89 ^b	16,30 ± 0,61 ^{ab}
PG-4090	67,2 ± 12,0 ^{ab}	16,48 ± 1,03 ^{ab}
PG-7540	43,0 ± 0,90 ^c	14,07 ± 0,92 ^b
PG-7560	37,0 ± 1,78 ^d	14,08 ± 1,81 ^b
PG-7590	38,3 ± 6,28 ^{cd}	13,81 ± 1,09 ^b

*Todas as formulações contêm: Proteína Isolada de soja (PIS): 6,5% (m/m); Glicerol (G): 80:20 (% PIS:G). Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Stuchell e Krotcha (1994) relacionaram o efeito do tratamento térmico com propriedades mecânicas e de interação com a água de filmes de PIS e verificaram que nos filmes obtidos a temperatura ambiente a solubilização da proteína não foi completa, sugerindo que o nível de desnaturação foi baixo impossibilitando a formação de fortes interações entre as cadeias destas. Este efeito pode explicar tanto a perda da estrutura dos filmes produzidos a 40°C no ensaio de solubilidade quanto a maior absorção de umidade apresentada por estes filmes (STUCHELL; KROCHTA, 1994).

Assim como o aumento de temperatura, o aumento do tempo de mistura também reduziu a solubilidade dos filmes em 24,6%, para a amostra produzida a 40°C, e 14% para a amostra produzida a 75°C, quando se passou de 40 para 60 minutos de mistura. A absorção de umidade apresentou redução estatisticamente significativa apenas para as amostras produzidas a 40°C, tendo uma redução de 11% desta propriedade. Nas amostras produzidas com tempos de mistura de 90 minutos, observou-se um aumento da solubilidade. O que pode sugerir que longos tempos de mistura podem ocasionar em quebra das ligações, devido a uma desnaturação excessiva, este efeito pode ter fragilizado os filmes.

Carpiné (2015) avaliando o efeito da intensidade de agitação da solução de produção de filmes de PIS pelo método de *casting* obteve uma redução de aproximadamente 47% da permeabilidade a água das amostras com o aumento da intensidade de agitação, mostrando que esta propriedade possui efeitos sobre o grau de desnaturação proteica contribuindo para o seu desdobramento e exposição dos terminais hidrofóbicos (CARPINÉ, 2015). Isto demonstra o efeito da agitação sobre as propriedades de interação com a água de filmes de PIS. No entanto, neste trabalho este efeito foi menos pronunciado por não se controlar a intensidade de agitação, mas sim o tempo em que esta ocorreu. O que sugere que a influencia do tempo de mistura é menor que a da intensidade de agitação.

Propriedades mecânicas

O estudo das propriedades mecânicas possibilita garantir que o filme terá resistência e estabilidade para suportar as tensões aplicadas durante seu uso. Desta forma, é importante avaliar tanto a tensão máxima suportada pelo filme como o quanto este **alonga** durante a aplicação desta tensão. Avaliar a capacidade da embalagem em manter

sua integridade durante a estocagem e assim proteger o alimento embalado são requisitos indispensáveis, onde a alongação e a tensão na ruptura são as principais propriedades mecânicas consideradas em filmes biodegradáveis (BUFFO; HAN, 2005).

Para se avaliar quais as condições de processamento permitem produzir um filme mais adequado em função da sua resistência mecânica, foi realizado o ensaio de resistência à tração das amostras, permitindo-se obter as informações de tensão e alongação na ruptura. Estes resultados estão disponíveis de forma numérica na Tabela 8, assim como os dados de espessura das amostras, que tem influencia direta nas propriedades avaliadas. É possível verificar que tanto o aumento da temperatura quanto do tempo de mistura ocasionam elevação da tensão e da percentagem de alongação na ruptura das amostras, sendo o aumento mais pronunciado à temperatura de 75°C.

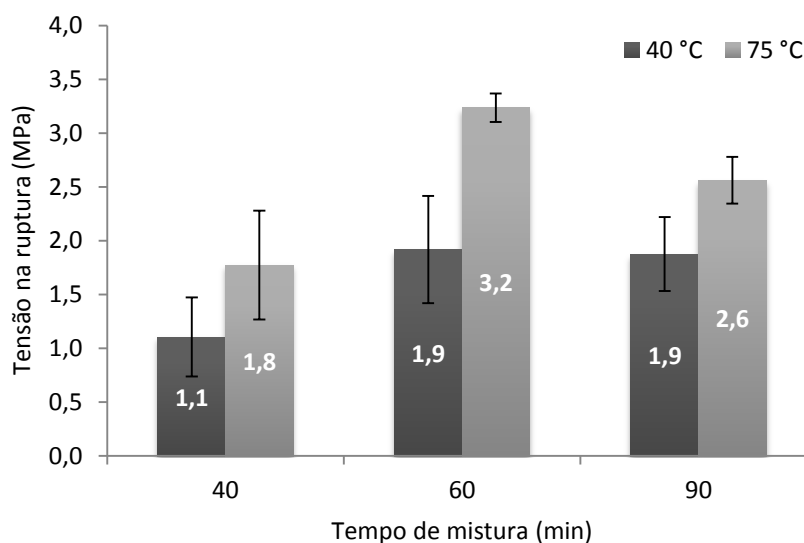
Tabela 8 – Resumo das propriedades mecânicas (espessura, t ; tensão na ruptura, σ_b ; deformação na ruptura, ϵ_b) das amostras da Etapa IA

<i>Filme</i>	<i>t (μm)</i>	<i>σ_b (MPa)</i>	<i>ε_b (%)</i>
PG-4040	90 ± 10	1,11 ± 0,37 ^c	102,2 ± 17,08 ^b
PG-4060	100 ± 20	1,92 ± 0,50 ^{bc}	154,8 ± 5,45 ^a
PG-4090	100 ± 20	1,88 ± 0,34 ^{abc}	152,5 ± 4,20 ^a
PG-7540	70 ± 10	1,77 ± 0,51 ^{bc}	114,6 ± 22,05 ^b
PG-7560	80 ± 10	3,24 ± 0,13 ^a	167,2 ± 13,89 ^a
PG-7590	100 ± 20	2,56 ± 0,22 ^{ab}	171,0 ± 5,03 ^a

*Todas as formulações contêm: Proteína Isolada de soja (PIS): 6,5% (m/m); Glicerol (Gli): 80:20 (% PIS:Gli). Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

O aumento da temperatura de processamento ocasionou um aumento de 68% na tensão de ruptura, no tempo de 60 minutos de mistura, e de 8% na alongação, o que também pode ser relacionado ao aumento da desnaturação das cadeias proteicas. (CARPINÉ et al., 2015; STUCHELL; KROCHTA, 1994) Quanto ao efeito do tempo de agitação da solução de *casting* pode-se observar que ocorreu um aumento significativo da resistência mecânica quando o tempo de mistura passou de 40 para 60 minutos, sendo que para os filmes produzidos a 40°C este foi de 72% na tensão na ruptura e 51% na alongação e para os filmes produzidos a 75°C foi de 83% e 46% respectivamente. No entanto, isto não foi observado com o aumento para 90 minutos de agitação, onde ocorreu inclusive uma queda da tensão na ruptura. Este efeito também sugere uma possível quebra das cadeias da proteína devido a uma desnaturação excessiva em altos tempos de mistura. Para melhor visualização do efeito dos parâmetros estudados sob a tensão na ruptura, na Figura 18 são apresentados os resultado gráficos para esta propriedade mecânica.

Figura 18 - Variação da tensão na ruptura com as condições de processamento avaliadas



Resultados semelhantes foram obtidos por Stuchell e Krotcha (1994) estudando o efeito da temperatura sobre as propriedades mecânicas dos filmes de proteína de soja, onde obtiveram filmes com um aumento de cerca de 20% na tensão na ruptura para filmes produzidos a 85°C se comparado a filmes obtidos a temperatura ambiente. Como comentado anteriormente, altas temperaturas facilitam o processo de quebra da estrutura tridimensional das proteínas, facilitando o processo de desnaturação desta e a formação de pontos de ligação mais fortes entre as cadeias. O que explica o aumento da tensão na ruptura com o aumento da temperatura (STUCHELL; KROCHTA, 1994; WU; ZHANG, 2001b).

O aumento do tempo de mistura de 40 minutos para 60 também proporcionou aumento da resistência dos filmes, isto se deve a maior homogeneização da solução, o que melhora o processo de desnaturação e proporciona um aumento da interação das cadeias da proteína com o plastificante, o que tem grande influencia na elongação e na resistência a tração dos filmes. Este efeito foi também por Carpiné (2015) avaliando o efeito da intensidade de agitação da amostras. Neste estudo os autores obtiveram um aumento de 26,31% na resistência a tração dos filmes quando os filmes foram expostos a uma homogeneização mais intensa (CARPINÉ, 2015).

Sendo as propriedades, tanto mecânicas quanto de interação com a água, mais próximas às desejadas na produção de filmes direcionados a embalagens para os filmes obtidos a 75°C se comparados aos obtidos a 40°C, definiu-se esta temperatura como a temperatura de processamento que será utilizada nas demais etapas deste estudo. Quanto ao tempo de mistura, pode-se observar que com 60 minutos de mistura os resultados apresentados foram mais próximos dos desejáveis do que os obtidos com 40 minutos. Não sendo significativa a diferença obtida nos resultados dos filmes produzidos com 90 minutos se comparados aos resultados com 60 minutos, escolheu-se este último como o tempo ideal, visto que tempos mais curtos de processamento otimizam os custos de produção do material.

5.1.2 Fase B - Avaliação do teor de glicerol

Na etapa I-B avaliou-se a influência do plastificante glicerol nas propriedades dos filmes de PIS. A utilização de um plastificante é necessária para modificar, principalmente, as propriedades mecânicas do material, visto que a proteína de soja isolada pura origina peças com alta rigidez e fragilidade, não sendo possível, portanto, se obter filmes flexíveis sem a utilização deste aditivo.

No entanto, a adição de um agente plastificante pode alterar outras propriedades de interesse como a solubilidade, a absorção de umidade e as propriedades óticas do filme. Sendo assim, é necessário estudar o efeito da adição deste aditivo nestas propriedades e avaliar qual o teor que propicia o melhor equilíbrio de propriedades.

Análise Visual

Avaliando-se o aspecto físico dos filmes verificou-se que foi possível obter um filme manuseável e possível de se extrair do molde em todos os teores de plastificante estudados. No entanto, ao toque, foi possível perceber que a amostra contendo 30% de glicerol apresentou um aspecto mais pegajoso que as demais amostras, podendo indicar que neste teor existe excesso de plastificante e que está ocorrendo exsudação deste para a superfície do filme. A partir da Figura 19, pode-se verificar que, qualitativamente, não se observa diferenças significativas de coloração entre os filmes.

Figura 19 – Fotografia dos filmes obtidos com PIS e os diferentes teores de glicerol avaliados



Para verificar se realmente não ocorreram diferenças significativas na coloração das amostras foi realizado o ensaio de colorimetria. Os resultados do ensaio podem ser vistos na Tabela 9, onde são apresentados tanto os parâmetros de cor quanto as propriedades de opacidade e brilho.

Tabela 9 – Propriedades óticas e de cor das amostras da Etapa I-B

Filme	L	a	B	Opacidade	Brilho
PSI-G10	81,9 ± 0,17 ^a	-1,70 ± 0,03 ^a	14,6 ± 0,19 ^a	29,3 ± 0,54 ^a	40,9 ± 6,95 ^a
PSI-G20	82,5 ± 0,61 ^a	-1,76 ± 0,20 ^a	14,0 ± 1,20 ^a	30,7 ± 1,85 ^a	41,7 ± 5,75 ^a
PSI-G30	82,5 ± 1,23 ^a	-1,64 ± 0,09 ^a	12,3 ± 1,01 ^a	28,7 ± 1,86 ^a	32,3 ± 3,65 ^a

*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Com a análise estatística dos resultados pode-se confirmar que não ocorreram diferenças significativas na coloração das amostras, nem quanto à opacidade e ao brilho, corroborando para o que foi observado na análise visual. Ciennamea *et al.* (2014) obtiveram resultados semelhantes quanto aos parâmetros de cor avaliando a variação do teor de glicerol em filmes a base de proteína de soja concentrada, quanto à opacidade dos filmes. Os autores verificaram que até teores de 40% de plastificante não ocorreram diferenças significativas na opacidade, mas que acima deste teor o aumento do plastificante elevou a opacidade dos filmes. Este efeito foi contrário ao esperado pelos pesquisadores. Estes esperavam que o glicerol elevasse a transparência dos filmes devido ao plastificante interferir nas interações entre as cadeias proteicas, diminuindo assim a absorvância na região visível conforme proposto por Sothornvit & Krochta (2001). Esta diferença nos resultados foi atribuída à ocorrência de domínios ricos em proteína e em glicerol, devido à micro separação de fases entre a proteína e o plastificante que se dá pela baixa interação destas em altos teores de plastificante. (CIANNAMEA; STEFANI; RUSECKAITE, 2014; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2000a).

Propriedades de interação com a água

Sendo os plastificantes polares os que apresentam melhor desempenho quando utilizados em conjunto com uma matriz biodegradável, faz-se interessante estudar o efeito da adição destes sobre as propriedades de interação com a água, visto que estes apresentam um forte caráter hidrofílico.

Desta forma, as propriedades de solubilidade e absorção de umidade foram avaliadas para se conhecer o teor ideal de plastificante que não prejudique a aplicação do filme em embalagens. Os resultados obtidos para estas propriedades podem ser observados na Tabela 10. Verifica-se que o aumento no teor de glicerol elevou em 66% a solubilidade e em 80% a absorção de umidade dos filmes quando se passou de 10% para 30% de glicerol na formulação. O aumento de 10% para 20% não apresentou diferença estatisticamente significativa para estas propriedades.

Tabela 10 - Propriedades de interação com a água das amostras da Etapa IB

Filme	Solubilidade 24h a 30°C (%)	Absorção de umidade em 24h a 75% UR (%)
PSI-G10	33,9 ± 2,70 ^b	9,5 ± 0,66 ^b
PSI-G20	36,4 ± 2,83 ^b	11,6 ± 1,69 ^b
PSI-G30	56,2 ± 4,80 ^a	17,1 ± 1,15 ^a

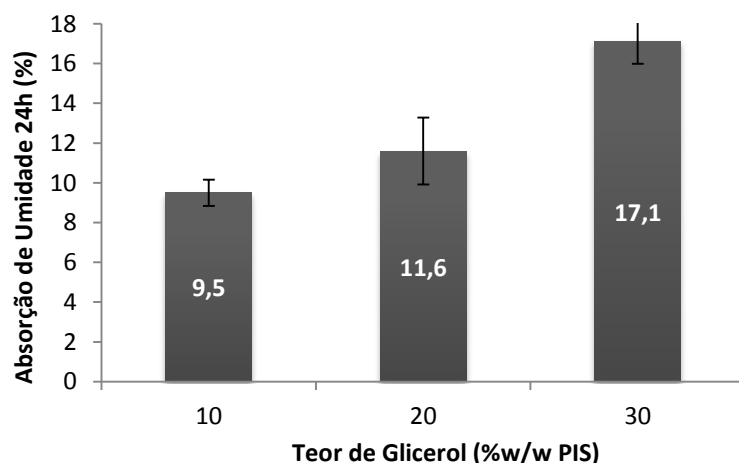
*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

O glicerol é um álcool de açúcar formado por uma molécula contendo três grupos hidroxilas o que torna sua afinidade com as moléculas de água muito alta e faz com que este seja hidrofílico, higroscópico e solúvel em água. Desta forma, o aumento do teor de glicerol na mistura torna esta cada vez mais hidrofílica e mais solúvel. (TOWEY; DOUGAN, 2012)

Kokozka *et al.* (2010) observou o mesmo efeito ao estudar a adição de diferentes teores de glicerol no desenvolvimento de filmes a base de PIS. Os autores avaliaram a absorção de água pela superfície do filme durante o ensaio de ângulo de contato, além de avaliarem a permeabilidade a água nos filmes. Estes verificaram que devido ao caráter hidrofílico do plastificante, o aumento no teor deste na mistura reduziu o ângulo de contato obtido, aumentou a velocidade de absorção da água pela superfície dos filmes e elevou à permeabilidade a água destes (KOKOSZKA *et al.*, 2010).

Bozic *et al.* (2015) também avaliou o efeito do teor de glicerol na produção de filmes de PIS, verificando que o aumento no teor de glicerol elevou a permeabilidade a água das amostras. Este efeito também foi atribuído ao caráter hidrofílico do plastificante (BOŽIČ *et al.*, 2015). Para facilitar a visualização, na Figura 20 pode-se observar graficamente o resultado do ensaio de absorção de umidade.

Figure 20 - Resultados do ensaio de absorção de umidade em 24h para as amostra da Etapa I-b



É interessante observar que este aumento, tanto para a absorção de umidade quanto para a solubilidade se deu em menor proporção entre as amostras com 10 e 20% de glicerol se comparado à variação apresentada pela amostra contendo 30% do plastificante. Este efeito pode demonstrar que ocorreu um excesso de plastificante nesta formulação, visto que mais sítios hidrofílicos do glicerol estão disponíveis para reagir com a água neste teor do que nas formulações anteriores.

Bozic *et al.* (2015) demonstrou que quando ocorre um aumento das interações de hidrogênio da molécula de proteína e do plastificante, resulta em uma redução dos grupos funcionais hidrofílicos disponíveis para interagir com a água, reduzindo a permeabilidade da água e a absorção de umidade (BOŽIČ *et al.*, 2015).

Além disto, conforme sugerido por Chen & Zhang (2005) em teores acima de 25% de glicerol existe a possibilidade de separação de fases em micro regiões ricas em proteína e outras ricas em glicerol, o que faz com que aumente a disponibilidade de grupos funcionais hidrofílicos disponíveis para absorver a água (CHEN; ZHANG, 2005).

Propriedades mecânicas

Quando se avalia o uso de plastificantes é de extrema necessidade a realização de um estudo das propriedades mecânicas do material, visto que a adição destes na formulação busca justamente modificar estas propriedades de forma a reduzir a rigidez da matriz polimérica.

Com o intuito de avaliar o efeito plastificante do glicerol e o teor ideal deste que possibilita a obtenção de peças flexíveis e ainda com resistência mecânica suficiente para sua aplicação como embalagem, os filmes produzidos foram avaliados quanto à resistência à tração. Na Tabela 11 são apresentados os valores numéricos obtidos neste ensaio assim como a média das espessuras das amostras avaliadas. Observa-se que o aumento no teor de glicerol reduziu a tensão na ruptura em cerca de 65%, quando se passou de 10% para 20% de glicerol e elevou a porcentagem de alongação dos filmes antes da ruptura em cerca de 460%, quando se fez a mesma alteração no teor do plastificante.

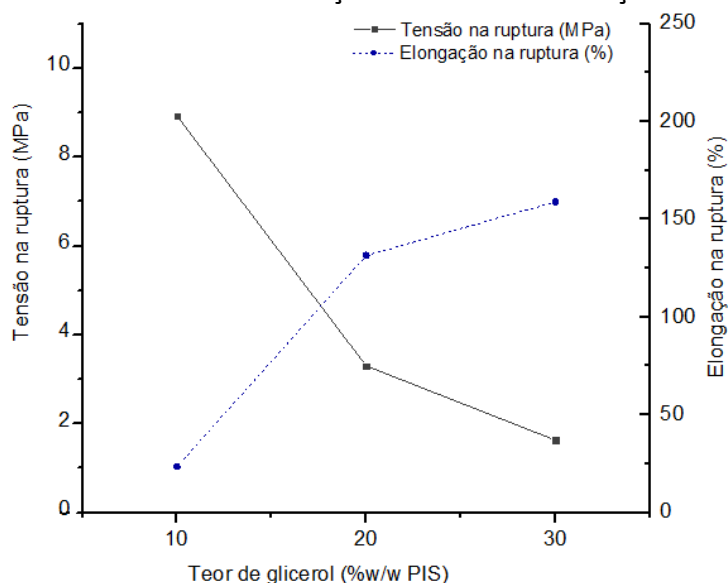
Tabela 11 – Propriedades mecânicas das amostras da Etapa I-B

Filme	t (μm)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PSI-G10	76,0 \pm 14	9,60 \pm 2,37 ^a	23,5 \pm 7,80 ^b
PSI-G20	65,0 \pm 12	3,30 \pm 0,16 ^b	131,5 \pm 27,32 ^a
PSI-G30	63,0 \pm 11	1,63 \pm 0,11 ^b	158,9 \pm 71,98 ^a

*Valores são médias \pm desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Para facilitar a visualização dos dados os valores obtidos no ensaio de tração estão apresentados graficamente na Figura 21. Nesta, é possível verificar que o efeito plastificante foi significativamente maior da amostra contendo 10% para a de 20% de glicerol do que para o teor de 30%.

Figure 21 - Propriedades mecânicas de tração dos filmes em função do teor de glicerol.



Quando o glicerol é adicionado a uma matriz de PIS os grupos hidroxila do plastificante podem interagir com os grupos laterais de aminoácidos da proteína diminuindo as interações inter e intramoleculares entre as cadeias de proteínas, como as ligações de hidrogênio, por exemplo. Este impedimento estérico entre as cadeias da macromolécula leva ao aumento dos espaços livres na estrutura desta ocasionando redução da tensão necessária para a ruptura das ligações e aumento da flexibilidade do material. Este comportamento, também chamado de efeito plastificante, é o responsável pela redução da tensão na ruptura e pelo aumento da alongação quando se eleva o teor de plastificante (BOŽIČ et al., 2015; GONTARD et al., 1994; GUERRERO et al., 2010; KOKOSZKA et al., 2010).

Resultados semelhantes foram obtidos por Cinnamea *et al.* (2014) onde também foi observado um aumento do efeito plastificante com a elevação do teor de glicerol em filmes a base de proteína de soja concentrada e, para os filmes produzido pelo método de *casting*, em teores acima de 30% de glicerol também não foram observados aumentos significativos da alongação na ruptura dos filmes.

Avaliando-se os resultados obtidos para as propriedades mecânicas em conjunto com as demais propriedades estudadas definiu-se o teor de glicerol de 20% como o ideal para produção dos filmes. Neste teor foi possível a plastificação desejada no filme, sendo a alongação significativamente superior à dos filmes obtidos com 10% de plastificante que apresentaram baixa alongação na ruptura. Embora se tenha obtido um aumento significativo da alongação para a amostra contendo 30% de plastificante, neste teor observou-se uma elevação significativa tanto da absorção de umidade quanto da solubilidade dos filmes relacionada a um excesso de plastificante, o que ocasionou a exclusão deste teor como o teor ideal.

5.2 Etapa II

Na Etapa II buscou-se estudar a utilização de diferentes aditivos para a modificação das propriedades hidrofílicas dos filmes biodegradáveis produzidos a base de proteína isolada de soja. Para isto, utilizaram-se as condições ótimas de processamento (temperatura de 75°C e 60 minutos de mistura) e de teor de plastificante (20% de glicerol) definidos na Etapa I. Esta etapa está dividida em três partes, onde estão apresentados os resultados do estudo avaliando a utilização de óleos vegetais como agentes hidrofóbicos na Etapa II-A, a utilização de ácido tânico como agente reticulante na Etapa II-B e por fim, na Etapa II-C, um estudo da interação dos dois de agentes modificadores em seus teores definidos como ideais nas etapas anteriores.

5.2.1 Fase A – Estudo da Adição de agentes hidrofóbicos

Na Etapa II-A serão apresentados os resultados do estudo da adição de dois diferentes óleos vegetais para avaliar sua efetividade como agentes hidrofóbicos. Os óleos estudados são o óleo de coco, que apresenta em sua composição, principalmente, ácidos graxos saturados, e o óleo de linhaça, composto principalmente por ácidos graxos insaturados.

Sendo estes óleos formados por cadeias lipídicas que se caracterizam, principalmente, pela sua baixa solubilidade em água sugere-se que a adição destes em filmes formados por componentes hidrofílicos possa reduzir sua absorção de umidade e solubilidade.

Desta forma, neste capítulo são avaliados tanto o efeito da adição destes na estrutura do material a partir do estudo dos espectros de FTIR e das propriedades térmicas, quanto das propriedades físicas de cor, solubilidade, absorção de umidade e nas propriedades mecânicas. Buscando avaliar a real possibilidade de utilização destes como agentes hidrofóbicos, além do teor que possibilite o melhor balanço entre as propriedades modificadas.

Espectroscopia de absorção no infravermelho

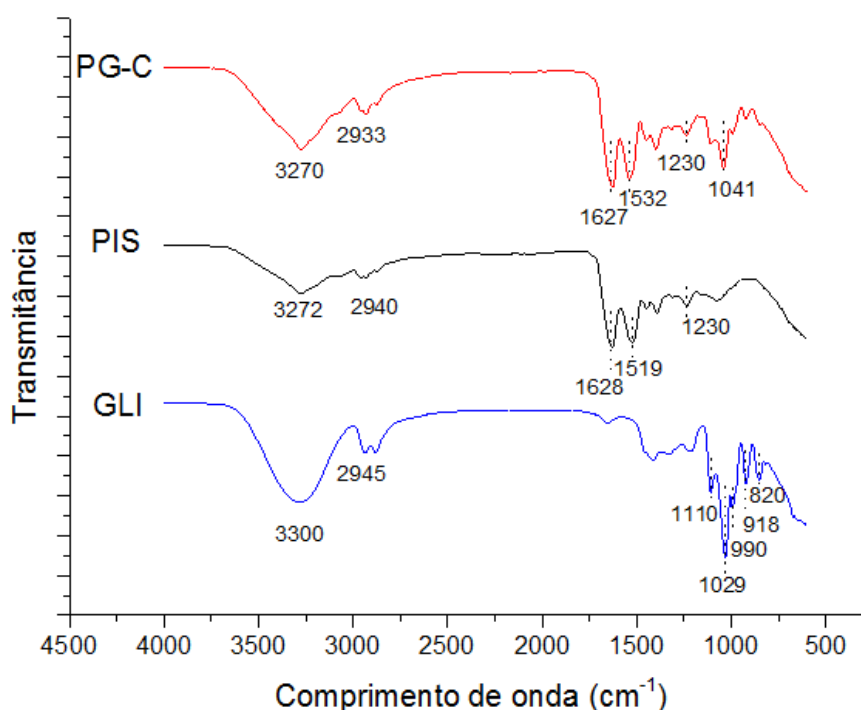
A espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) é uma técnica utilizada para avaliar interações entre os componentes constituintes dos filmes e, assim, auxiliar na caracterização estrutural destes. Nesta etapa, a técnica de FTIR foi aplicada para examinar a ocorrência de interações entre a PIS, o glicerol e os óleos de coco (OC) e de linhaça (OL).

Na Figura 22 são apresentados os espectros de FTIR da amostra controle (PG-C) assim como os dos principais componentes desta amostra, a matriz polimérica PIS e o plastificante glicerol. Posteriormente, na Figura 23, serão apresentados os espectros das amostras contendo o teor central dos óleos estudados assim como os espectros destes óleos puros. A divisão dos resultados foi realizada desta forma, para facilitar a compreensão dos espectros e das estruturas apresentadas pelas amostras.

No espectro referente à PIS pura, os principais picos de absorção observados são o pico em 1628 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O presente nas amidas primárias, em 1519 cm^{-1} referente à flexão da ligação N-H e o estiramento da ligação C-N das amidas secundárias e em 1450 cm^{-1} a deformação da ligação C-H. O pico em 1230 cm^{-1}

¹ pode ser atribuído ao estiramento da ligação C-N e à flexão da ligação N-H característicos das amidas terciárias (BOŽIČ et al., 2015; GUERRERO et al., 2011; YE et al., 2019). A larga banda aparente entre 3600-3000 cm^{-1} é referente aos grupos OH e NH, que são os grupos disponíveis para formar ligações de hidrogênio com o grupo carbonila da cadeia lipídica (GUERRERO et al., 2011; KARNNET; POTIYARAJ; PIMPAN, 2005).

Figura 22 - Espectros de FTIR para a amostra controle (PG-C), a PIS e o glicerol (GLI)

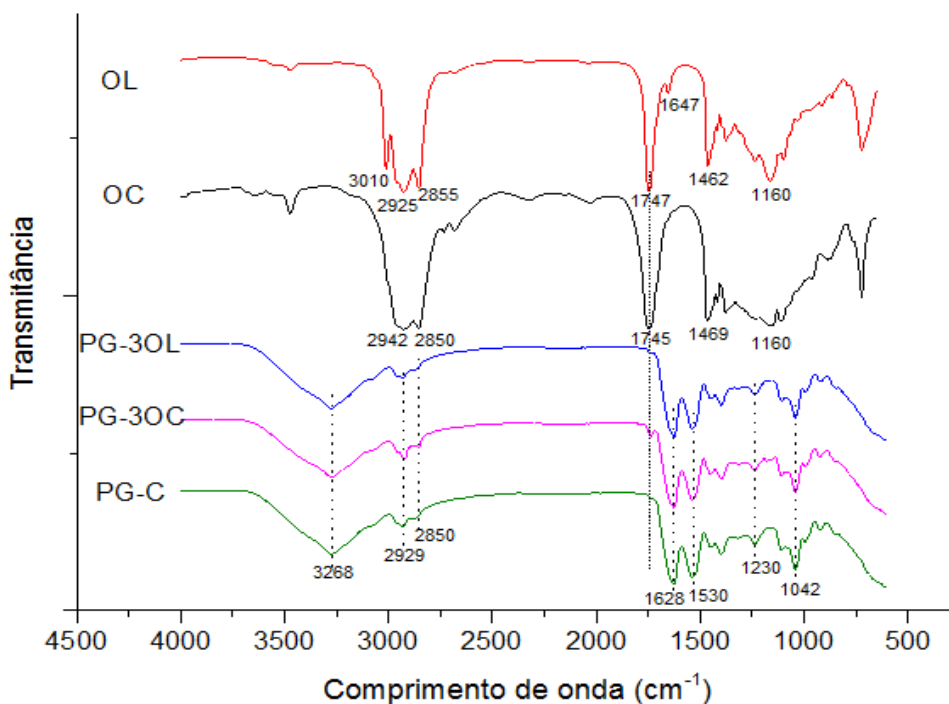


No espectro referente ao plastificante glicerol os principais picos encontram-se na região de 800-1150 cm^{-1} e são correspondentes às vibrações das ligações C-C e C-O, sendo os picos em 820 cm^{-1} , 918 cm^{-1} e 990 cm^{-1} associados às vibrações do esqueleto C-C. O pico aparente em 1029 cm^{-1} está associado ao estiramento da ligação C-O nas posições C1 e C3, já o pico em 1110 cm^{-1} é relacionado ao estiramento da ligação C-O na posição C2. Também é observado uma intensa e larga banda entre 3600-3000 cm^{-1} correspondente aos grupos OH do glicerol (BOŽIČ et al., 2015).

No espectro referente ao filme controle (PG-C) que contém 20% de glicerol são observados tanto as bandas características das amidas, devido a matriz de PIS, quanto os principais picos característicos do glicerol. Os três espectros obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura (BOŽIČ et al., 2015; GUERRERO et al., 2011; YE et al., 2019).

Na Figura 23 são apresentados os espectros de FTIR-ATR para as amostras dos óleos utilizados (OC e OL), do filme controle (PG-C) e dos filmes contendo um valor intermediário (3%) de cada um dos agentes hidrofóbicos estudados (PG-3OC e PG-3OL).

Figura 23 – Espectros de FTIR para o OL, OC, PG-3OL, PG-3OC e PG-C



Quanto aos espectros dos óleos puros é interessante comentar que os principais picos observados nestes são: para o OL o pico em 3010 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $=\text{C-H}$; os picos em 2925 cm^{-1} para o OL e em 2942 cm^{-1} para o OC são referentes ao estiramento assimétrico das ligações C-H dos grupos metílicos. Os picos em 2850 cm^{-1} para o OL e 2855 cm^{-1} para o OC são referentes ao estiramento simétrico das ligações C-H. O pico referente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ dos ésteres aparece em 1747 cm^{-1} para o OL e em 1745 cm^{-1} para o OC. Para o OL aparece ainda um pico em 1647 cm^{-1} referente ao estiramento da instauração $\text{C}=\text{C}$. São também observadas, para ambos os óleos duas bandas muito próximas e de média intensidade entre $1430\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$, que se relacionam aos modos de deformação angular simétrica no plano para CH_2 e deformação assimétrica de CH_3 . As bandas aparentes entre 1400 cm^{-1} e 800 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C-O (CASTILHO-ALMEIDA; DOS, 2012; YE et al., 2019).

Os espectros referentes aos filmes contendo 3% dos óleos estudados foram semelhantes ao do filme controle, apresentando os picos referentes a amidas I, II e III em 1628 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} , respectivamente, e as bandas referentes às ligações C-C e C-O do glicerol entre 850 e 1110 cm^{-1} .

Os picos situados na região entre 3000 e 2850 cm^{-1} podem ser associados às interações hidrofóbicas (CARPINÉ et al., 2015; WANG et al., 2014), sendo observados nas amostras contendo os dois diferentes tipos de óleos e também para o filme controle, o que pode ser explicado pela metodologia utilizada para formação dos filmes, visto que esta envolve diferentes mecanismos de desnaturação da proteína e que, mesmo uma desnaturação parcial, pode levar à ruptura da estrutura terciária e assim a exposição dos grupos hidrofóbicos alocados no interior da estrutura proteica (CARPINÉ et al., 2015). Segundo Wang et al. (2014) o aparecimento do pico em 2929 cm^{-1} após a adição dos óleos indica um grau de interação entre as cadeias da PIS e a cadeia lipídica dos óleos.

(WANG et al., 2014) Pode-se observar que este pico foi mais intenso para a amostra contendo 3% de óleo de coco. Além disto, a redução da intensidade do pico em 3268 cm^{-1} referente às ligações de OH e NH apresentadas por ambos os filmes com adição de óleos, enquanto não ocorreu variação dos picos referentes à amida I (1628 cm^{-1}) e amida II (1530 cm^{-1}) pode indicar que as ligações intermoleculares de hidrogênio foram formadas pela interação entre os ácidos das cadeias lipídicas e da proteína e os grupos polares (WANG et al., 2014).

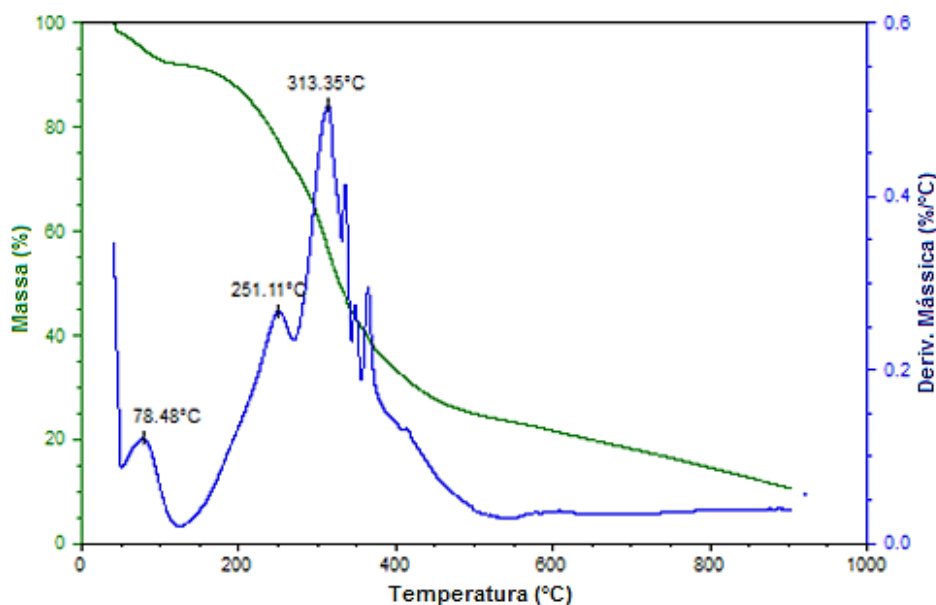
Para a amostra PG-3OL o desaparecimento do pico característico da ligação C=O da cadeia lipídica (1742 cm^{-1}) pode indicar que ocorreu reação entre estes grupos com o grupo NH_2 ou os grupos OH da cadeia da proteína (YE et al., 2019). Ye et al. (2019) observaram um comportamento semelhante na adição de ácido esteárico em filmes de PIS. Guerrero et al. (2011) também obteve este comportamento com a adição de ácido láctico em filmes de proteína de soja modificados com gelatina. Ambos os autores relacionaram o desaparecimento do pico a formação de ligações entre o grupo C=O e o grupo NH_2 da proteína (GUERRERO et al., 2011; YE et al., 2019).

O mesmo não foi observado para a amostra com óleo de coco (PG-3OC), indicando que estas interações não ocorreram com a mesma intensidade para esta amostra. No entanto a maior intensidade apresentada no pico em 2929 cm^{-1} para esta amostra pode sugerir que a interação do óleo de coco com a cadeia da proteína se dá principalmente pela formação de ligações de hidrogênio. Resultados semelhantes foram observados para Carpiné et al. (2015) na adição de óleo de coco em filmes de PIS (CARPINÉ, 2015).

Análise Termogravimétrica

Na análise termogravimétrica, a perda de massa devido à volatilização por degradação térmica dos produtos é monitorada em função da temperatura. Esta é utilizada para avaliar a estabilidade térmica dos materiais. A curva termogravimétrica (TG) e a da derivada termogravimétrica (DTG) para a amostra controle PG-C, composta por uma matriz de PIS e 20% do plastificante glicerol, são mostradas na Figura 24.

Figura 24 – Curvas referentes à análise termo gravimétrica para a amostra controle PG-C

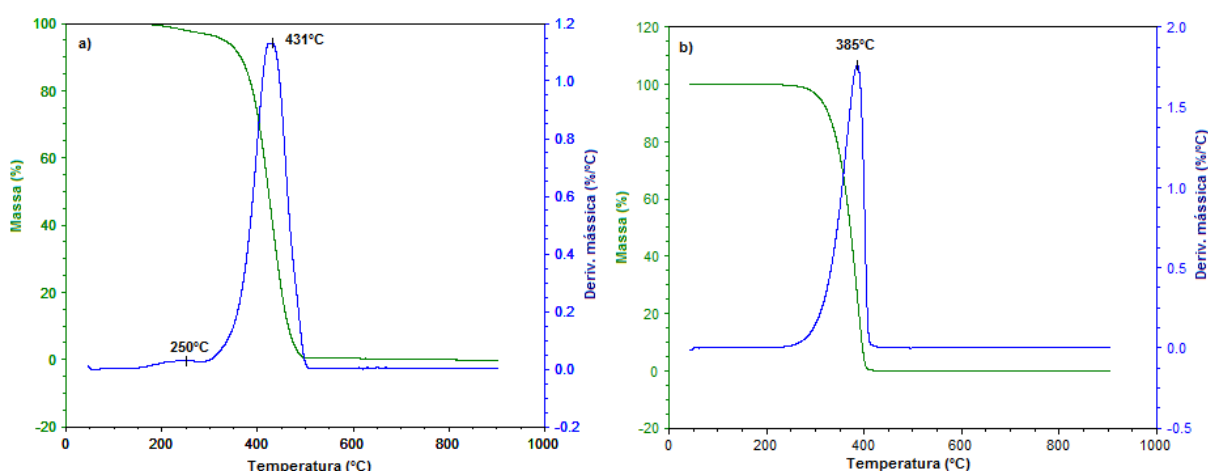


Para o filme controle (PG-C) foram identificados três eventos principais, sendo o primeiro um evento de desidratação (entre 50 e 100°C) devido à presença de umidade livre ou fracamente associada à proteína. O segundo evento é atribuído à degradação do glicerol e o terceiro evento (conjunto de eventos secundários sequenciais) que ocorre entre 280 e 450°C é relacionado à quebra e decomposição dos diversos componentes da PIS (GUERRERO et al., 2011; LI et al., 2016; YE et al., 2019). As curvas obtidas foram semelhantes às encontradas em trabalhos como o de Ye *et al.* (2019), Carpiné *et al.* (2015) e Guerrero *et al.* (2011) (CARPINÉ et al., 2015; GUERRERO et al., 2011; YE et al., 2019).

Na Figura 25 a e b são apresentadas as curvas de TG e DTG para o óleo de linhaça e de coco, respectivamente. Observa-se na figura 23-a, dois eventos de decomposição do óleo de linhaça indicado pelos dois picos de DTG, um pequeno e largo em 250°C e outro intenso em 431°C que correspondem aos componentes (ácidos graxos) contidos neste. Cabe ressaltar que o óleo de linhaça possui maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados (C18:3, C18:2 e C18:1) que são sensíveis ao oxigênio e ao calor formando radicais livres e gerando produtos de alta massa molar (oligômeros e/ou polímeros) que proporcionam maior estabilidade térmica (CHOE; MIN, 2006).

Já nas curvas TG/DTG do óleo de coco, Figura 25-b, apresenta-se apenas um evento de decomposição, cujo pico intenso e estreito da DTG em 385°C indica a temperatura onde a velocidade de decomposição é máxima, correspondente aos ácidos graxos saturados (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0) que compõem este. Comparando ambos os óleos, observa-se que o óleo de linhaça apresenta maior estabilidade térmica e sua cinética de decomposição é mais lenta do que o óleo de coco.

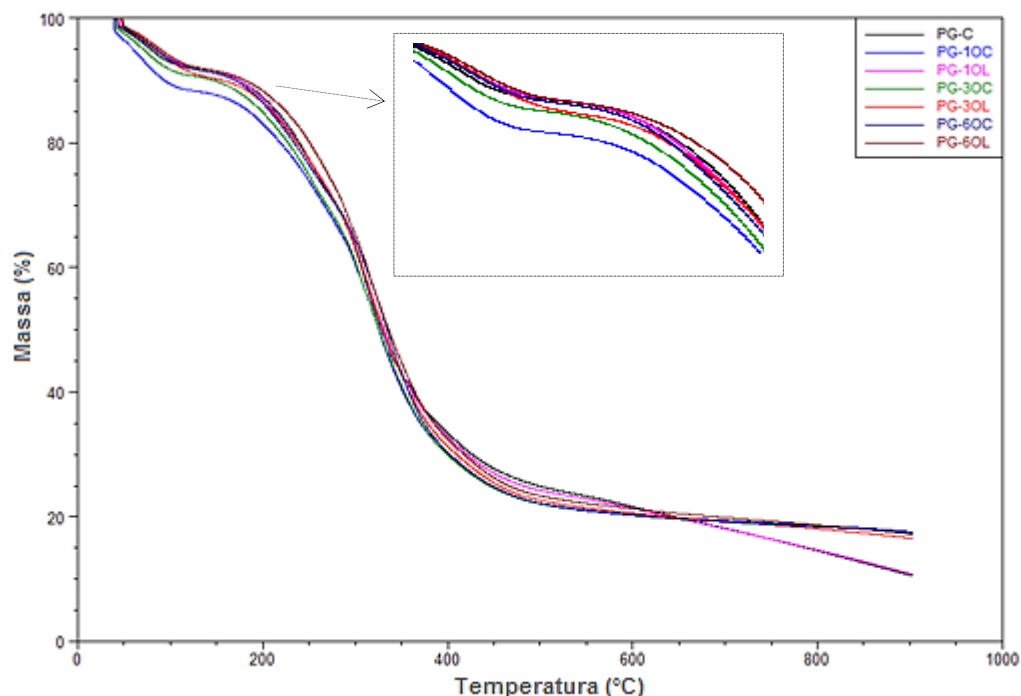
Figura 25 - Curvas referentes à análise termo gravimétrica para os óleos puros de: a) linhaça e b) coco



Na Figura 26 são apresentadas as curvas de TG para a amostra controle e para os filmes contendo 1%, 3% e 6% dos óleos de coco e linhaça. Observam-se três estágios de perda de massa, o primeiro relacionado à umidade dos filmes, o segundo relacionado ao glicerol e aos óleos e finalmente a PIS. É possível visualizar que os filmes de PIS contendo o OL apresentaram maior estabilidade térmica do que os com OC; estes resultados estão

relacionados à maior estabilidade apresentada pelo OL como mostram os resultados da Figura 25.

Figura 26 – Curvas de TG das amostras controle e com os diferentes teores de óleo

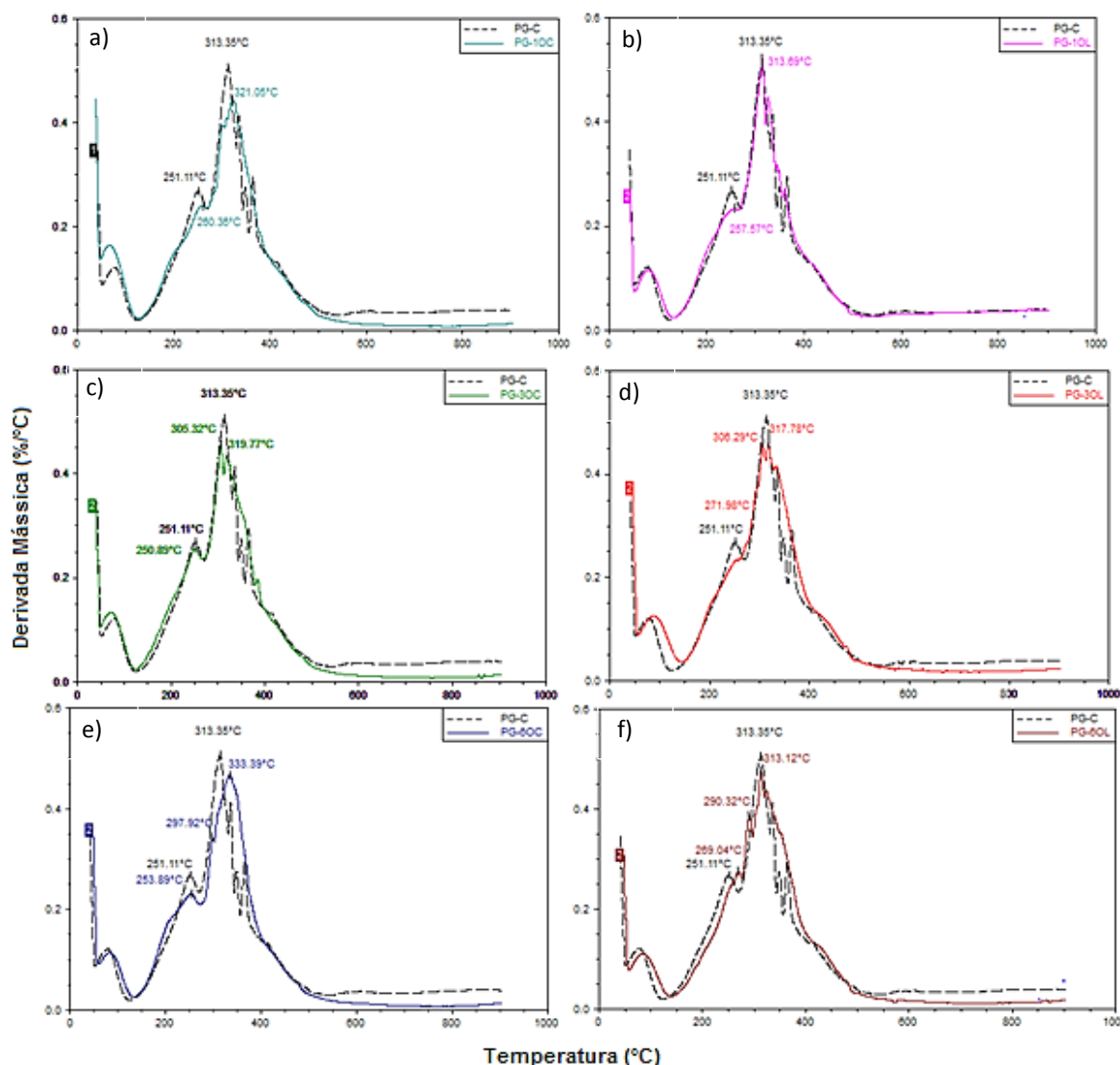


Já na Figura 27 são apresentados os comparativos entre as curvas de DTG das amostras com 1%, 3% e 6%, de ambos os óleos, com a amostra controle. Para todas as amostras foi possível observar a ocorrência dos três picos correspondentes aos eventos térmicos principais identificados na amostra controle, referentes à evaporação da água, decomposição do glicerol e degradação da cadeia da proteína.

Para as amostras contendo a partir de 3% de óleo de linhaça foi possível observar um deslocamento maior do pico referente à degradação do glicerol, sendo que para a amostra com 3% este se mostrou apenas um ombro em 252,8°C, aparecendo um novo pico em 306,3°C e para a amostra com 6% de OL também foi possível verificar uma separação deste em dois diferentes picos. Este deslocamento pode sugerir que esteja ocorrendo uma interação entre os óleos e o glicerol. Este efeito foi também observado nos trabalhos de Ye *et al.* (2019), que estudou a adição de ácido esteárico a filmes de PIS e Guerrero *et al.* (2011) que avaliou a adição de ácido lático e óleos de soja e oliva em filmes de proteína de soja. Ambos os autores atribuíram este comportamento a ocorrência de interação entre os ácidos graxos estudados e o glicerol, sugerindo também que o aparecimento de um novo pico pode ser atribuído à interação de moléculas pequenas do ácido com a cadeia do glicerol que retardam sua degradação (GUERRERO *et al.*, 2011; YE *et al.*, 2019). Para a amostra contendo óleo de coco os picos referentes à degradação do glicerol apresentaram cerca de 20% de perda de massa, conforme dados da Tabela 12, mostrando que nestes praticamente todo o glicerol foi consumido naquela temperatura de degradação.

É possível observar também que não foram verificados picos na temperatura de degradação dos óleos estudados. Segundo Guerrero *et al.* (2011) relatou em seu trabalho este fato sugere que ocorreram interações entre a cadeia dos óleos e a cadeia da proteína (GUERRERO *et al.*, 2011).

Figura 27 – Curvas de DTG comparativas entre as amostras com diferentes teores de óleos e a amostra controle. a) PG-10C, b) PG-10L, c) PG-30C, d) PG-30L, e) PG-60C e f) PG-60L



Na Tabela 12 foram detalhados os dados da curva de degradação térmica das amostras avaliadas. Nesta foram apresentadas as temperaturas em que ocorrem 15, 30 e 50% de perda de massa, dados referentes aos principais picos da DTG e o resíduo apresentado a 950°C. Avaliando-se os resultados apresentados nesta, observa-se que os óleos apresentaram comportamentos distintos quanto a estabilidade térmica.

A adição de baixos teores de óleo de coco (OC) até o teor de 3% , praticamente não interferiu na estabilidade térmica dos filmes. No entanto, a amostra com 6% de OC apresentou menor estabilidade no início da degradação e maior estabilidade após o primeiro evento de degradação, elevando a temperatura de perda de 50% de massa de 328,2°C para 334,5°C.

Já a adição de óleo de linhaça (OL) em baixos teores teve pouca influência na temperatura de degradação dos filmes se comparado ao filme controle. O aumento no teor adicionado deste ocasionou um aumento da estabilidade térmica do filme, modificando a temperatura onde ocorreu 50% de perda de massa de 328,2°C no filme controle (PG-C) para 336,1°C para o filme com 6% de OL.

Tabela 12 – Dados obtidos dos termogramas das amostras controle e com adição de diferentes teores de OC e OL

Amostra	Temperatura de perda de massa em diferentes percentuais (°C)			Dados referentes aos principais picos da DTG				Resíduo a 950°C (%)
	15%	30%	50%	$T_{p_{gli}}$ (°C)	%m	$T_{p_{pis}}$ (°C)	%m	
PG-C	215,0	279,5	328,2	251,1	20,2	313,4	61,4	10,5
PG-1OC	185,0	266,3	325,4	260,4	19,8	321,1	51,1	17,6
PG-3OC	198,8	269,4	325,5	250,9	20,4	305,3	52,9	17,4
PG-6OC	207,9	279,6	334,5	253,9	20,0	333,4	54,2	17,4
PG-1OL	211,9	280,2	329,8	257,6	18,7	313,7	62,5	10,8
PG-3OL	209,3	280,3	331,1	252,8	16,9	317,8	41,5	16,6
PG-6OL	224,9	287,3	336,1	269,0	18,3	313,1	49,1	17,2

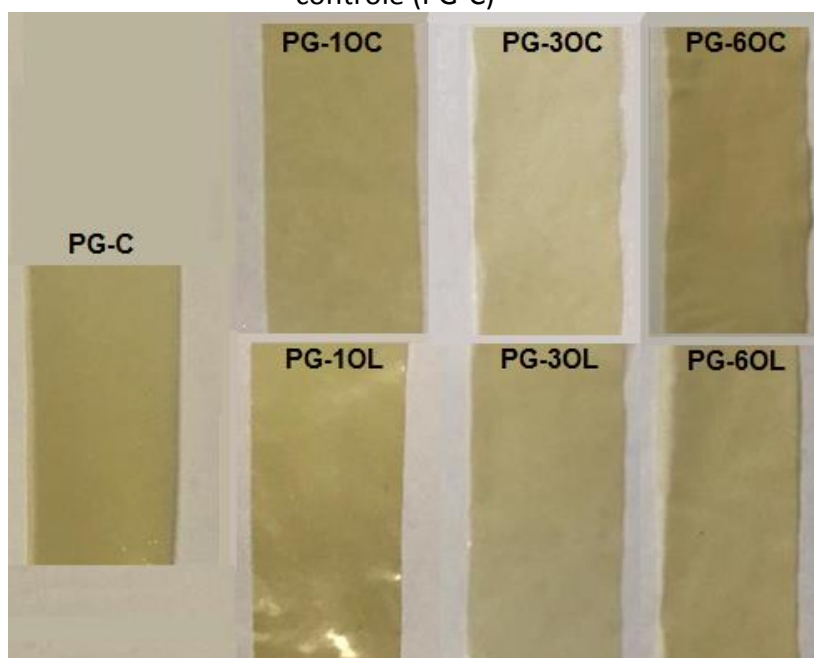
Diversos autores também relataram a elevação da estabilidade térmica dos filmes com a adição de óleos e ácido graxos em filmes de proteína de soja como Guerrero *et al.* (2011), com a adição dos óleos de soja e oliva, Carpiné *et al.* (2015) com a adição de óleo de coco e Ye *et al.* (2019) no estudo da adição de ácido esteárico. Os autores correlacionaram este aumento com as interações ocorridas entre o a cadeia dos ácido graxos e da proteína de soja (CARPINÉ *et al.*, 2015; GUERRERO *et al.*, 2011; YE *et al.*, 2019).

É possível observar que a adição dos óleos aumentou o resíduo obtido na degradação a 950°C, sendo este elevado para todos os teores de OC adicionados e para teores acima de 3% de OL. Ye *et al.* (2019) observou um comportamento semelhante, sugerindo que isto ocorre pela presença de fortes interações entre a cadeia da proteína e do ácido graxo estudado, que podem formar estruturas cíclicas que são carbonizadas durante a degradação térmica do polímero (YE *et al.*, 2019).

Análise Visual

Avaliando-se qualitativamente os filmes obtidos foi possível verificar que a adição do OC e OL, em todos os teores estudados, não interferiu na manuseabilidade e na estabilidade destes após a extração do molde após secagem, realizada em estufa por 2h a 60°C. Sendo que, ao toque foi possível verificar que a amostra com maior teor, para ambos os óleos, se mostrou um pouco pegajosa, sugerindo a exsudação de excesso de óleo para a superfície do filme. Uma fotografia dos filmes é apresentada na Figura 28, onde é possível verificar que estes demonstraram-se homogêneos e que não foi possível correlacionar a coloração com o teor de óleo adicionado ou perceber diferenças entre os óleos estudados através apenas da análise visual.

Figura 28 – Fotografia dos filmes obtidos com a adição dos óleos (OC e OL) e filme controle (PG-C)



Desta forma, para melhor avaliar a influência dos óleos e seus teores na coloração das amostras foi realizada a análise de colorimetria que tem seus resultados apresentados na Tabela 13. Foram observadas principalmente variações na coloração e na opacidade dos filmes.

Tabela 13 – Resultados da análise de colorimetria para as amostras avaliadas na Etapa II-A

Filme	L	A	B	Brilho	Opacidade
PG-C	85,5 ± 1,34 ^a	-0,51 ± 0,13 ^{ab}	15,2 ± 0,78 ^c	55,2 ± 6,9 ^{ab}	26,1 ± 0,76 ^d
PG-10C	81,5 ± 0,33 ^{cd}	-0,71 ± 0,05 ^b	19,3 ± 0,84 ^{ab}	63,0 ± 7,47 ^a	32,8 ± 0,25 ^{abc}
PG-30C	82,1 ± 0,17 ^{bc}	-1,26 ± 0,01 ^c	19,0 ± 0,58 ^{ab}	55,9 ± 6,01 ^{ab}	31,5 ± 3,07 ^{ab}
PG-60C	82,8 ± 0,26 ^{bc}	-1,28 ± 0,04 ^c	17,2 ± 0,50 ^{bc}	40,0 ± 3,71 ^{bc}	29,3 ± 0,48 ^{bcd}
PG-10L	83,9 ± 0,97 ^{ab}	-1,10 ± 0,15 ^c	14,1 ± 2,48 ^c	54,8 ± 9,79 ^{ab}	27,7 ± 1,72 ^{cd}
PG-30L	80,9 ± 0,13 ^{cd}	-0,65 ± 0,05 ^{ab}	20,1 ± 0,17 ^{ab}	41,2 ± 0,83 ^{bc}	35,5 ± 1,75 ^{ab}
PG-60L	80,1 ± 0,39 ^d	-0,31 ± 0,19 ^a	22,6 ± 0,75 ^a	56,1 ± 7,04 ^{ab}	36,4 ± 1,50 ^a

*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Quanto à coloração dos filmes, a adição de óleo de coco em teores a partir de 3% provocou uma redução do avermelhamento da amostra reduzindo o parâmetro a, utilizado para avaliar esta propriedade, de $-0,51 \pm 0,13$ para $-1,28 \pm 0,04$. Já a adição de óleo de linhaça não teve influência significativa neste parâmetro. A adição de ambos os óleos aumentou significativamente o parâmetro b, que representa a tendência da cor de ir do azul para o amarelo, ou seja, os filmes se tornaram mais amarelados. Este efeito está possivelmente relacionado à coloração dos óleos, e por este motivo foi mais pronunciado para o óleo de linhaça que para o óleo de coco, visto que este possui uma coloração amarela.

Resultados semelhantes foram apresentados por Hopking *et al.*, que estudou a adição de óleo de linhaça a filmes de proteína de soja. Este atribuiu as modificações de cor à

coloração amarelo alaranjada apresentada pelo óleo de linhaça. Outros autores também relataram a modificação na coloração de filmes com a adição de óleo vegetais devido a cor do aditivo como Valenzuela *et al.* (2013) na adição de óleo de girassol em filmes de quinoa e quitosana e Atarés *et al.* (2010) na adição de óleo essencial de canela em filmes de PIS (ATARÉS *et al.*, 2010b; HOPKINS *et al.*, 2015a; VALENZUELA; ABUGOCH; TAPIA, 2013).

O brilho não foi significativamente alterado, não apresentado correlação entre o teor e/ou o tipo de óleo utilizado. Já a opacidade foi elevada com a adição de ambos os óleos, não sendo possível estabelecer diferenças significativas entre eles. Este aumento pode ser explicado pela possível cristalização dos óleos após o processo de secagem dos filmes, onde os agregados lipídicos podem ter coalescido e formado zonas concentradas nas estruturas, levando o aumento da opacidade destes filmes (Carpiné *et al.* – 2015b).

O aumento da opacidade dos filmes decorrente da adição de componentes hidrofóbicos em matrizes proteicas também foi observado por diversos autores como Carpiné *et al.* (2015) na adição de óleo de coco em filmes de proteína de soja emulsionados, Bertan *et al.*, (2005) em filme de gelatina, triacetina e blindados com componentes hidrofóbicos e Wang *et al.*, (2014) no estudo de filme de PIS com ácido oleico e esteárico. Os autores relacionaram este aumento a possível separação de fase dos óleos e formação de cristais ou regiões ricas no componente lipídico (BERTAN *et al.*, 2005; CARPINÉ *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014).

Propriedades de interação com a água

Para avaliar os efeitos da adição de óleo de coco e de linhaça nas propriedades de interação com a água dos filmes obtidos, estudaram-se as propriedades de solubilidade em 24h de imersão em água e o teor de umidade absorvido neste mesmo período quando estes se encontram em atmosfera controlada em 75% de umidade relativa. Os resultados para ambos os ensaios encontram-se na Tabela 14, onde é possível observar que a adição dos óleos em diferentes teores provocou a redução tanto da solubilidade quanto da absorção de umidade das amostras.

Tabela 14 – Propriedades de interação com a água das amostras da Etapa II-A

Filme	Solubilidade 24h a 30°C (%)	Absorção de umidade em 24h a 75% UR (%)
PG-C	35,4 ± 2,62 ^a	16,0 ± 0,46 ^a
PG-1OC	26,8 ± 1,20 ^b	14,5 ± 0,73 ^{ab}
PG-3OC	24,4 ± 0,85 ^{bc}	12,7 ± 0,81 ^b
PG-6OC	32,3 ± 0,26 ^a	12,5 ± 0,61 ^b
PG-1OL	27,6 ± 0,59 ^b	11,6 ± 0,49 ^b
PG-3OL	22,4 ± 0,47 ^c	12,2 ± 0,99 ^b
PG-6OL	26,2 ± 0,22 ^b	11,7 ± 0,50 ^b

*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey (p < 0,05), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Pode-se observar que para ambos os óleos em teores de até 3% o aumento da quantidade de óleo adicionado reduziu significativamente a solubilidade dos filmes, sendo a redução de cerca de 31% para as amostras PG-3OC e de 37% para a PG-3OL. No entanto, em teores acima deste observou-se um aumento desta propriedade, sendo que para o óleo de coco a solubilidade se mostrou estatisticamente igual à amostra controle. Este efeito sugere que a partir de certo teor de óleo ocorrem dificuldades na homogeneização da solução, não permitindo boa interação das cadeias do óleo com as da proteína. A ocorrência de aparente exsudação nos filmes com o teor de 6% de óleo corrobora com esta hipótese. Neste sentido, Binsi *et al.* (2013), estudando a adição de óleo de coco a filmes de quitosana observou que a partir de um certo teor o óleo de coco ocorre uma separação de fases necessitando da adição de um agente surfactante para formar novamente uma emulsão com a solução formadora de filmes.

Quanto à absorção de umidade observou-se que a adição de ambos os óleos provocou uma redução da umidade absorvida pelos filmes. Para o óleo de coco (OC) esta redução só foi estatisticamente significativa a partir do teor de 3% de óleo, sendo esta propriedade foi reduzida de 16% no filme controle para 12,7% para o filme com maior teor de OC (redução de 20,6%). Já para o óleo de linhaça a redução da absorção de umidade foi observada em todos os teores, não apresentando diferença significativa entre estes. Com este óleo foi possível reduzir esta propriedade para 11,6% com a adição em seu menor teor (redução de 27,5%).

Resultados semelhantes foram obtidos por vários autores para diferentes ácidos graxos e óleos vegetais como Guerrero *et al.* (2011) com o óleo de soja e de oliva, Hopkings *et al.* (2014) com o óleo de linhaça, Carpiné *et al.* (2015) com o óleo de coco, e Ye *et al.* (2019), para o ácido esteárico (CARPINÉ *et al.*, 2015; GUERRERO *et al.*, 2011; HOPKINS *et al.*, 2015b; YE *et al.*, 2019). Hopkings *et al.* (2014) e Ye *et al.* (2019) associam este efeito ao aumento das ligações hidrofóbicas no filme, reduzindo assim a disponibilidade da cadeia de proteína para interagir com a água (HOPKINS *et al.*, 2015b; YE *et al.*, 2019). Os resultados obtidos quanto à interação das amostras com a água reforçam que se pode atribuir o caráter de agente hidrofóbico para ambos os óleos estudados.

Propriedades mecânicas

Com o intuito de avaliar a influência da adição dos óleos vegetais em seus diferentes teores nas propriedades mecânicas realizou-se o ensaio de resistência à tração nos filmes estudados, a fim de garantir que esta propriedade não impossibilitará o uso destes como agentes hidrofóbicos.

Os resultados obtidos neste ensaio, assim como a média de espessura das amostras avaliadas encontram-se na Tabela 15. Nesta, pode-se observar que a adição de óleo aos filmes provocou mudanças tanto na tensão máxima suportada pelos filmes na ruptura (σ_b) quanto na elongação máxima (ϵ_b) apresentada por estes.

Tabela 15 – Propriedades mecânicas das amostras avaliadas na Etapa II-A

Filme	t (μm)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PG-C	66,7 \pm 8,25	3,38 \pm 0,99 ^d	167,2 \pm 25,0 ^c
PG-1OC	55,7 \pm 3,70	8,86 \pm 1,39 ^{ab}	124,6 \pm 67,0 ^{cd}
PG-3OC	74,2 \pm 5,83	8,91 \pm 0,78 ^{ab}	117,3 \pm 30,8 ^{de}
PG-6OC	61,2 \pm 14,4	3,94 \pm 0,56 ^c	277,6 \pm 51,7 ^b
PG-1OL	61,7 \pm 15,5	4,84 \pm 1,00 ^{cd}	188,6 \pm 11,2 ^b
PG-3OL	64,0 \pm 7,20	11,9 \pm 1,77 ^a	67,9 \pm 15,5 ^e
PG-6OL	66,0 \pm 12,7	6,55 \pm 0,69 ^c	446,3 \pm 10,9 ^a

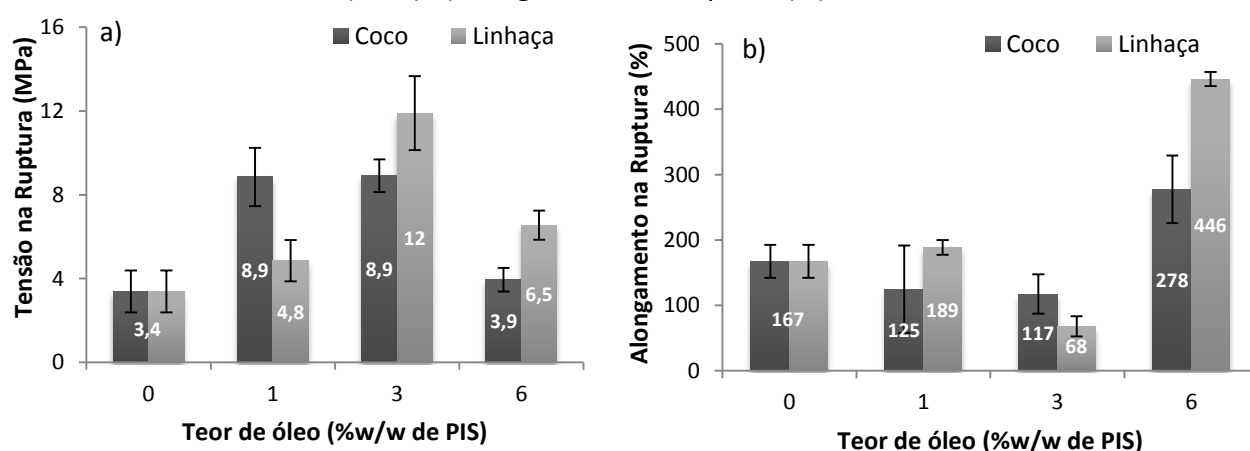
*Valores são médias \pm desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

A adição de ambos os óleos elevou a tensão na ruptura, sendo os máximos valores obtidos de 11,9 MPa para a amostra PG-3OL e de 8,91 MPa para a amostra PG-3OC, estes aumentos se mostraram significativos se comparados a amostra controle que apresentou tensão na ruptura de 3,38 MPa. Já quanto à alongação para teores de óleo de até 3% ocorreu uma redução desta de 167% na amostra controle para 67,9 % para a amostra PG-3OL e para 117,3 % para a amostra PG-3OC.

A partir da adição do teor de 6% de ambos os óleos ocorreu uma brusca redução da tensão máxima na ruptura, sendo esta mais pronunciada para a amostra contendo óleo de coco, além disto, ocorreu uma elevação da porcentagem de alongação na ruptura, sugerindo um comportamento de plastificação do filme.

Os resultados podem ser mais bem observados nas Figuras 29 a e b onde é possível visualizar graficamente os resultados de tensão na ruptura e alongação, respectivamente, para os diferentes teores de óleo.

Figura 29 – Resultados do ensaio de tração das amostras avaliadas. a) Tensão na ruptura (MPa) b) Alongamento na ruptura (%)



O comportamento mecânico obtido não era esperado, pois grande parte dos relatos encontrados na literatura sugerem que a adição de lipídios provoca um efeito contrário ao obtido até 3% de óleo adicionado, reduzindo a tensão na ruptura e aumentando a alongação, conforme relatado por Carpiné *et al.* (2015) estudando a adição de óleo de

coco em filmes de PIS, Binsi *et al.* (2013) verificando os efeitos do óleo de coco em filmes de quitosana, Bertran *et al.* (2005) avaliando a adição de ácido láurico a filmes de gelatina e Tongnuanchan *et al.* (2014) para filmes de gelatina com óleo essencial de citronela. Este efeito de plastificação, sugerido na literatura, é atribuído às baixas interações entre as cadeias lipídicas e a cadeia da proteína em relação às interações proteína-proteína (BERTAN *et al.*, 2005; BINSI; RAVISHANKAR; SRINIVASA GOPAL, 2013; CARPINÉ *et al.*, 2015; TONGNUANCHAN; BENJAKUL; PRODPRAN, 2013).

No entanto, efeito semelhante ao verificado neste estudo foi relatado por alguns autores como Hopkins *et al.* (2015) em filmes de proteína de soja com a adição de óleo de linhaça, Atarés *et al.* (2010) estudando o efeito da adição de óleo essencial de canela a filmes de PIS, Chick *et al.* (2002) avaliando a adição de ceras a filmes produzidos com caseína e Monedero *et al.* (2000) avaliando o teor de ácido oleico em filmes de PIS. Estes autores sugeriram que o comportamento verificado pode indicar a presença de interações mais fortes das cadeias lipídicas com as cadeias de proteína (ATARÉS *et al.*, 2010a; CHICK; HERNANDEZ, 2002; HOPKINS *et al.*, 2015b; MONEDERO *et al.*, 2009). A ocorrência destas interações é corroborada pelos resultados obtidos na análise de FTIR e na análise termogravimétrica.

Hopkins *et al.* (2015) também verificou uma redução na tensão da ruptura para teores acima de 5% de óleo adicionado e relacionou esta redução a uma distribuição mais desuniforme do óleo na solução em teores mais elevados, não permitindo-se a formação de uma emulsão deste na solução formadora do filme. Este comportamento concorda com os resultados obtidos no estudo da solubilidade e colorimetria dos filmes e sugere que com a baixa homogeneização as interações entre o óleo e a proteína sejam reduzidas, fazendo com que as partículas de óleo formadas acabem agindo apenas como um plastificantes (HOPKINS *et al.*, 2015b).

Os comportamentos distintos verificados na literatura reforçam o sugerido por Gontard *et al.* (1994), de que o efeito da adição de lipídios no comportamento mecânico dos filmes depende tanto das características do lipídeo quanto de sua capacidade de interagir com a matriz proteica (GONTARD *et al.*, 1994).

Os resultados apresentados neste capítulo indicam que tanto o óleo de coco como o óleo de linhaça apresentam boa performance como agentes hidrofóbicos, sendo que este último apresenta interações mais fortes com a cadeia da proteína de soja. Os resultados de solubilidade e de resistência mecânicas sugerem que o teor ideal para ambos os aditivos é de 3%, visto que acima deste teor não se obtém uma homogeneização ideal destes com a solução formadora de filme.

5.2.2 Fase B – Estudo da adição de um agente reticulante

Na Etapa II-B será avaliada a influência da adição de diferentes teores de ácido tânico nas propriedades do filme de PIS, buscando, principalmente, a redução da solubilidade e da absorção de umidade deste. Sendo o ácido tânico um composto fenólico hidrolisável formado pela esterificação de várias moléculas de ácido gálico com uma molécula de D-glicose, encontram-se diversos relatos na literatura sobre a formação de ligações

cruzadas entre as cadeias deste e as moléculas de proteínas (HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012; PICCHIO et al., 2018b; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010b; WANG et al., 2017).

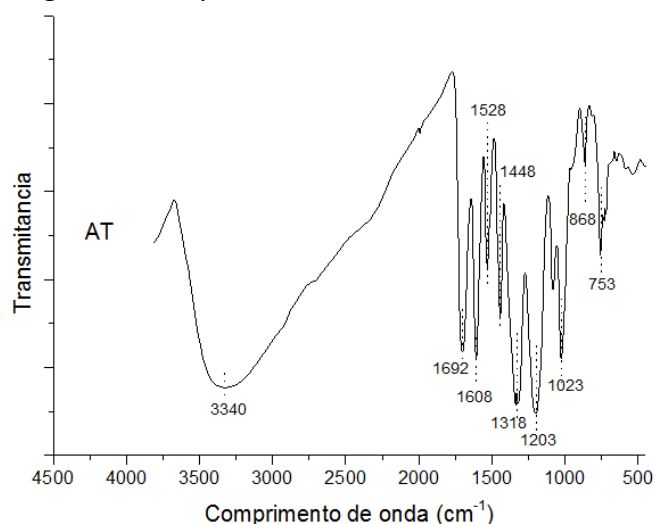
Desta forma, neste capítulo, buscou-se avaliar a variação nas propriedades estruturais, térmicas e físicas, como a modificação da coloração, solubilidade, absorção de umidade e nas propriedades mecânicas de filmes formados com a PIS e diferentes teores deste composto fenólico.

Espectroscopia de absorção no infravermelho

Neste capítulo a técnica de FTIR-ATR será utilizada para estudar as interações que ocorrem entre as moléculas de PIS, glicerol e o ácido tânico, buscando conhecer as estruturas formadas pela mistura destes componentes em diferentes teores do agente reticulante. Para este estudo, serão utilizadas as informações apresentadas no Capítulo 5.2.1, na Figura 20, onde foi apresentado o espectro da PIS pura, do glicerol e do filme controle. Lembrando que os principais picos presentes no espectro do filme controle são os picos referentes às ligações O-H e N-H na região entre $3600-3000\text{ cm}^{-1}$, os picos referentes às amidas em 1630 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O (amida I), em 1530 cm^{-1} referente à flexão da ligação N-H e o estiramento da ligação C-N (amida II) e o pico em 1230 cm^{-1} atribuído ao estiramento da ligação C-N e a flexão da ligação N-H (amida III) e os picos referentes às vibrações das ligações C-C e C-O do glicerol na região de $800-1150\text{ cm}^{-1}$.

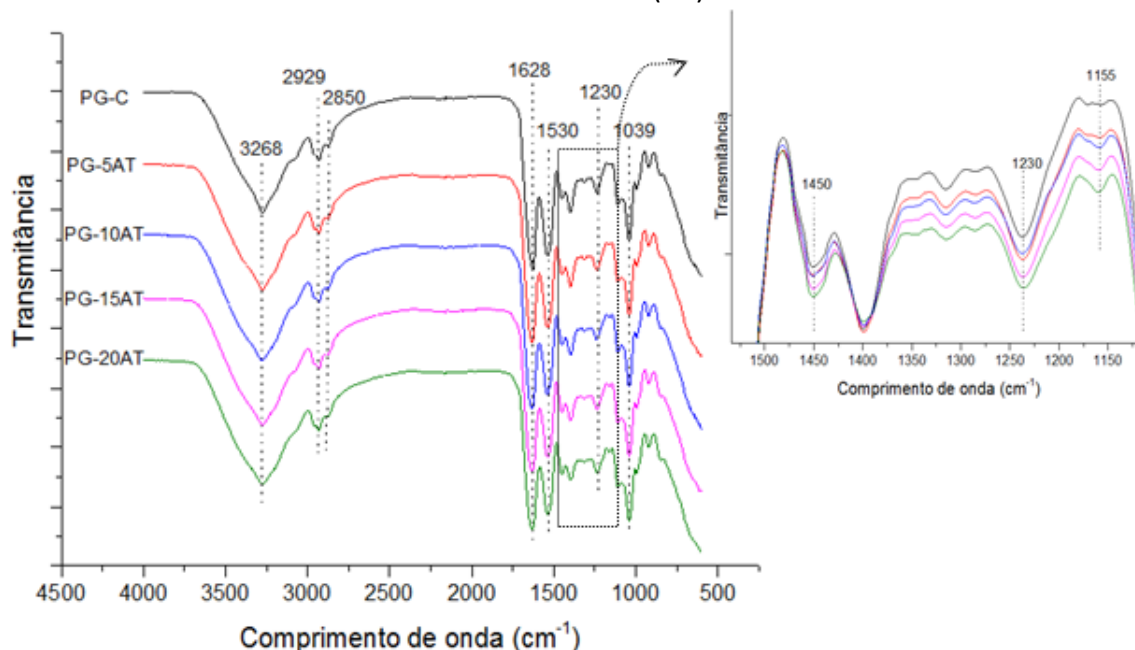
Na Figura 30 é apresentado o espectro referente ao ácido tânico. Neste são visualizados os principais picos referentes ao espectro do ácido tânico que são o largo pico em 3340 cm^{-1} referentes aos grupos OH da molécula, o pico em 1692 cm^{-1} é referente ao estiramento das ligações C=O, o pico em 1608 cm^{-1} é relacionado ao estiramento assimétrico da ligação C-O em compostos aromáticos. Os picos que aparecem em 1528 e 1448 cm^{-1} são os picos relacionados às ligações C=C dos compostos aromáticos, em 1318 e 1203 cm^{-1} também aparecem picos referentes ao estiramento assimétrico da ligação C-O em compostos aromáticos. Em 1023 cm^{-1} encontra-se o pico referente ao estiramento da ligação C-O-C e em 753 cm^{-1} o pico referente à deformação fora do plano das ligações C-H (XIA et al., 2015).

Figura 30 – Espectro de FTIR do ácido tânico



Na Figura 31 verificam-se os espectros de FTIR para o filme controle e para os demais filmes estudados contendo diferentes teores de ácido tânico.

Figura 31 – Espectros de FTIR para os filmes controle e com adição dos diferentes teores de ácido tânico (AT)



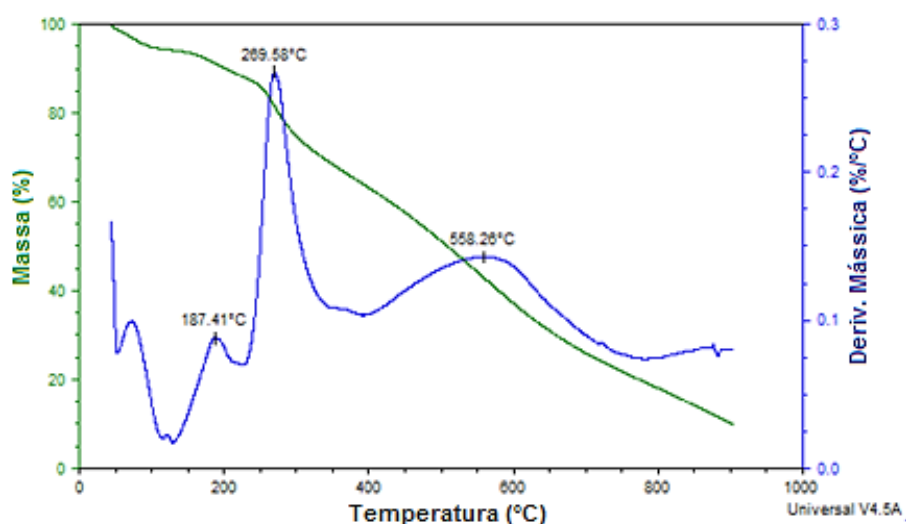
Como não foi identificada a presença de nenhum pico referente ao espectro do AT (picos referentes às ligações C=O e C=C) pode-se sugerir que ocorreram interações entre este e as moléculas de proteína, conforme sugerido na literatura em trabalhos como os de Rivero *et al.* (2010) avaliando a adição de ácido tânico em filmes de quitosana e Novac *et al.* (2009) estudando a adição de ácido tânico a filmes de quitosana e em blends de quitosana com alginato e carboximetilcelulose.

Insaward *et al.* (2015) sugere que a formação de pontos de reticulação através da ligação covalente pode ser verificado pelo aumento dos picos referentes as ligações C-N e C-S, sendo que nos espectros de FTIR só se consegue verificar a presença das ligações C-N (INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015). Avaliando a ampliação do espectros na região entre 1500-1100, que pode ser visualizado na Figura 29, é possível observar que com o aumento do teor de ácido tânico ocorreu um aumento nos picos localizados em 1450 e 1230 cm^{-1} que são picos característicos da ligação C-N (BOŽIČ *et al.*, 2015; GUERRERO *et al.*, 2011; HAN *et al.*, [s.d.]) e é possível ainda verificar a formação de um pico por volta de 1155 cm^{-1} , que é atribuído a ligação C-N-C (SMITH, 2019). O aparecimento destes picos pode sugerir que estejam ocorrendo interações covalentes entre o ácido tânico, oxidado em o-quinona, e a cadeia da proteína pelo mecanismo sugerido por Quan *et al.* (2019) que pode ser visualizado na Figura 5 (QUAN *et al.*, 2019b). A presença de reticulação poderá ser confirmada com a análise das demais propriedades dos filmes.

Análise Termogravimétrica

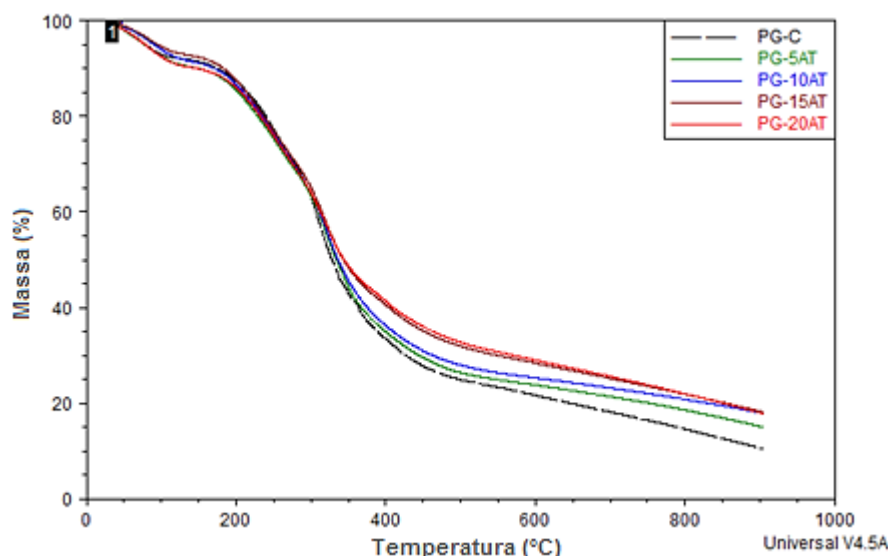
Com os resultados da análise termogravimétrica se buscou avaliar, a partir dos dados de perda de massa com o aquecimento, o efeito da adição de diferentes teores de ácido tânico na estabilidade térmica dos filmes. A fim de melhor compreender o comportamento do aditivo utilizado são apresentadas na Figura 32 as curvas de TG e DTG deste. Nesta, verifica-se que a degradação térmica do ácido tânico ocorre em quatro eventos térmicos, sendo o primeiro devido a desidratação, o segundo evento localizado entre 150 e 230°C é relatado como referente à eliminação de ácido acético, no terceiro evento podem ocorrer a eliminação tanto de ácido acético, de 1,2,3 benzeno triol e de dióxido de carbono. O último evento foi relatado na literatura como de decomposição do dióxido de carbono (XIA et al., 2015)

Figura 32 – Curvas de TG e DTG para o ácido tânico puro



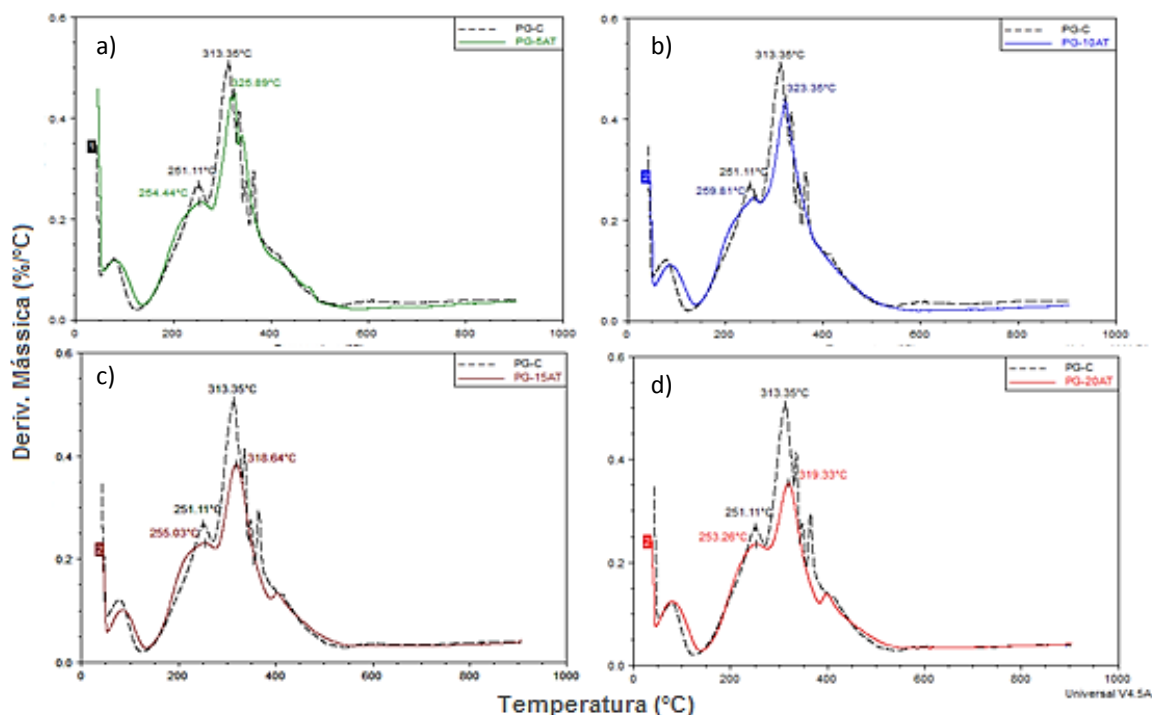
Como relatado no capítulo anterior, o filme controle apresenta três eventos principais de degradação, o primeiro referente à evaporação de água livre, o segundo à degradação do glicerol e por fim um evento onde ocorre a degradação da cadeia da proteína isolada de soja. As curvas de TG obtidas para o filme controle e para os filmes contendo ácido tânico são apresentadas na Figura 33, onde é possível verificar que a perda de massa dos filmes contendo o composto fenólico ocorre em temperaturas mais altas que a para o filme controle.

Figura 33 – Curvas de TG para o filme controle e para os filmes contendo ácido tânico



Para facilitar a visualização dos eventos ocorridos na Figura 34 são apresentadas as curvas de DTG para cada filme em comparação com o filme controle e na Tabela 16 são apresentados os dados referentes às temperaturas e perdas de massa ocorridas.

Figura 34 - Curvas de DTG comparativas entre as amostras com diferentes teores de óleos e a amostra controle. a) PG-5AT, b) PG-10AT, c) PG-15AT, d) PG-20AT



Pode-se observar que os filmes obtidos também apresentam três eventos térmicos principais, sendo o primeiro relacionado à evaporação de água, o segundo que ocorre entre 150 e 300°C é referente à degradação do glicerol, o que pode ser confirmado pela perda de massa apresentada neste pico (conforme a Tabela 16) que é de cerca de 20%, teor de glicerol adicionado aos filmes, e o terceiro que ocorre entre 300 e 450°C é associado à degradação da cadeia da proteína. (PICCHIO et al., 2018b) Conforme sugerido

pelas curvas de TG, as temperaturas em que ocorrem os principais eventos são mais altas do que as apresentadas nos picos do filme contendo apenas a proteína. O aumento da estabilidade térmica dos filmes também pode ser sugerido pelo aumento da temperatura onde ocorre a perda de 50% massa, demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados obtidos dos termogramas das amostras controle e com adição de diferentes teores de ácido tânico

Amostra	Temperatura de perda de massa em diferentes percentuais (°C)			Dados referentes aos principais picos da DTG				Resíduo a 950°C (%)
	15%	30%	50%	$T_{p_{gli}}$ (°C)	%m	$T_{p_{pis}}$ (°C)	%m	
PG-C	215,0	279,5	328,2	251,1	20,2	313,4	61,4	10,5
PG-5AT	202,5	273,1	333,7	254,4	21,8	325,9	53,5	15,0
PG-10AT	209,1	276,7	336,6	259,8	20,3	323,4	53,2	18,0
PG-15AT	213,3	281,1	343,4	255,0	22,1	318,6	52,5	18,2
PG-20AT	205,9	275,5	344,0	253,3	21,0	319,3	51,4	17,9

Resultados semelhantes foram obtidos por Picchio *et al.* (2018) ao estudar as propriedades térmicas de filmes de caseína com ácido tânico. Os autores sugeriram que este efeito ocorre devido à presença de reticulações formadas entre a cadeia do ácido tânico e a proteína, aumentando sua estabilidade térmica. O autor sugere ainda que devido ao aumento destas ligações ocorre uma elevação significativa do resíduo apresentado após a degradação. Esta elevação do resíduo ocorre pela formação de estruturas cíclicas que carbonizam durante a degradação térmica (PICCHIO *et al.*, 2018b).

Este efeito também pode ser observado para os filmes de PIS contendo ácido tânico sendo que o resíduo apresentado a 950°C foi de 10,5% na amostra controle para 17,9% na amostra contendo 20% de ácido tânico. Isto é, um aumento de 80% do teor de cinzas quando comparando ao branco.

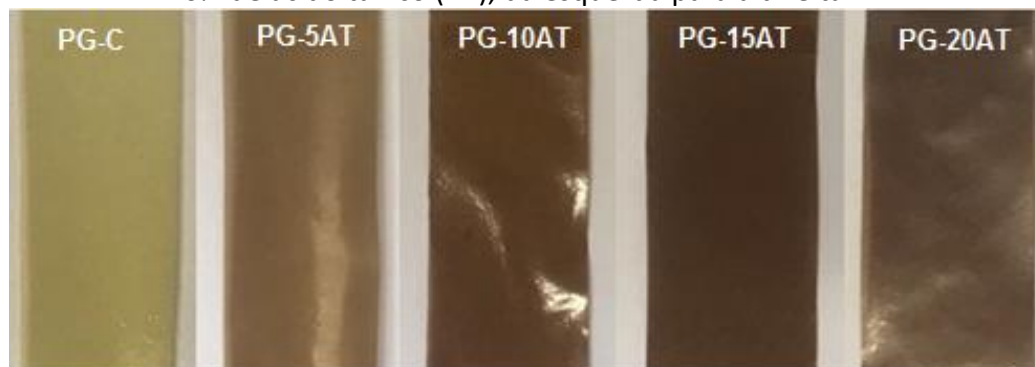
Outros autores como Nie *et al.* (2017), avaliando o uso de ácido tânico em filmes de proteína mio fibrilar de carpa prateada, e Wang *et al.* (2017), estudando a adição de ácido tânico e montmorilonita a filmes de PIS, também observaram um aumento da estabilidade térmica e uma elevação do resíduo após a degradação, e sugeriram que este efeito se deu pelas interações que ocorreram entre o composto fenólico e a proteína estudada. Embora, no estudo de Wang *et al.* (2012) seja interessante considerar que a adição de montmorilonita também apresente influencia sobre o resíduo apresentado (NIE *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Os resultados apresentados corroboram com o obtido no estudo dos espectros de FTIR, indicando a ocorrência de formação de pontos de reticulação entre o ácido tânico e a cadeia da proteína isolada de soja.

Análise visual

Avaliando, qualitativamente, o aspecto dos filmes obtidos com a adição de ácido tânico pode-se perceber que ocorrem modificações significativas na coloração dos filmes. Foi possível obter filmes com aspecto homogêneo e boa manuseabilidade, sendo que ao

toque não foi possível perceber mudanças na flexibilidade dos filmes. Na Figura 35 é possível observar o aspecto visual destes.

Figura 35 – Fotografia do filme controle e dos filmes obtidos com a adição de 5, 10, 15 e 20% de ácido tânico (AT), da esquerda para a direita



Para averiguar as modificações de coloração e também de brilho e opacidade apresentadas nos filmes devido à adição do agente reticulante, realizou-se o estudo de colorimetria que tem seus dados apresentados na Tabela 17. Os dados apresentados confirmam que, assim como sugerido pela análise visual, ocorreram alterações significativas na coloração dos filmes.

Tabela 17 - Resultados da análise de colorimetria para as amostras avaliadas na Etapa II-B

Filme	L	a	b	Brilho	Opacidade
PG-C	85,5 ± 1,34 ^a	-0,51 ± 0,13 ^c	15,2 ± 0,78 ^{bc}	55,2 ± 6,90 ^{ab}	26,1 ± 0,76 ^c
PG-5AT	51,2 ± 2,42 ^b	12,6 ± 0,55 ^b	24,8 ± 0,64 ^a	40,8 ± 3,16 ^b	35,2 ± 0,20 ^c
PG-10AT	49,7 ± 3,20 ^b	12,3 ± 0,71 ^b	23,2 ± 1,01 ^a	49,3 ± 8,89 ^{ab}	47,3 ± 0,15 ^b
PG-15AT	36,8 ± 2,53 ^c	15,0 ± 0,10 ^a	17,0 ± 1,64 ^b	67,0 ± 5,65 ^a	56,0 ± 2,60 ^{ab}
PG-20AT	32,8 ± 0,83 ^c	14,2 ± 0,77 ^a	11,4 ± 1,30 ^c	60,0 ± 1,90 ^a	58,1 ± 1,86 ^a

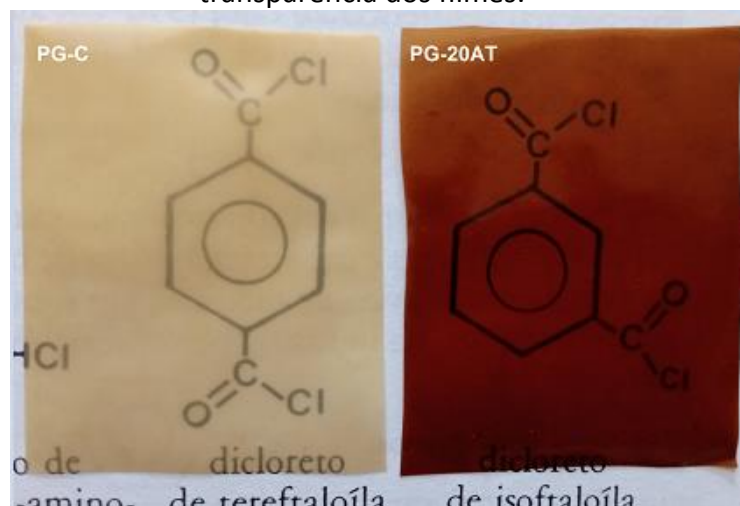
*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

O aumento do teor de ácido tânico reduziu o parâmetro L de 85,5 para a amostra controle (PG-C) para 32,8 no filme com maior teor do ácido adicionado (PG-20AT), confirmando o escurecimento das amostras. O parâmetro a, que indica o avermelhamento das amostras, foi significativamente elevado com o aumento do teor de ácido tânico. E o parâmetro b, que indica a tendência de coloração do azul para o amarelo, inicialmente subiu indicando as amostras estavam mais amareladas e depois para as amostras contendo 15 e 20% do agente reticulante caiu novamente. Este comportamento dos filmes indica que a coloração destes está tendendo para a coloração marrom à medida que se aumenta o teor do componente fenólico, o que era esperado visto que este apresenta uma coloração marrom-avermelhada. Este comportamento foi observado em vários trabalhos com a adição de ácido tânico e até de outros compostos fenólicos como o de Rivero *et al.* (2010) que avaliou a adição de ácido tânico em filmes de quitosana e Insaward *et al.* (2015) que estudou a adição de diferentes ácido fenólicos em filmes de proteína de soja. Em ambos os trabalhos

a coloração foi relacionada à coloração do componente adicionado (INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010b).

Quanto ao brilho, não ocorreram variações estatisticamente significativas, já a opacidade foi bastante elevada passando de 26,1 do filme controle para 58,1 para a amostra com adição de maior teor de ácido tânico. Este efeito também foi relatado nos trabalho de Insaward *et al.* (2015) e Wang *et al.* (2017), ambos avaliando a adição de compostos fenólicos em filmes de proteína de soja e foi atribuído a coloração escura destes aditivos, além do aumento da formação de pontos de reticulação (INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015; WANG *et al.*, 2017). No entanto, é interessante comentar que mesmo com o aumento da opacidade o filme ainda se mostrou transparente mesmo na amostra PG-20AT, como é possível visualizar na Figura 36.

Figura 36 – Fotografia dos filmes PG-C e PG-20AT sobre texto para demonstrar a transparência dos filmes.



Além da transparência buscada para o mercado de embalagens, alguns nichos de mercado podem se beneficiar de coloração escura do filme desenvolvido, como os de produtos que necessitam de baixa exposição à luz como óleos, alimentos já fatiados ou descascados, sucos naturais e outros produtos que possuam tendência à oxidação.

Propriedades de interação com a água

Sendo a hidroflicidade da PIS a principal limitante para o seu uso na produção de embalagens, e a redução desta um dos principais efeitos da reticulação sugerido na literatura, o estudo das propriedades de interação com a água para a comprovação da funcionalidade do ácido tânico como agente reticulante é essencial. Desta forma, buscou-se estudar o efeito da adição de diferentes teores de AT nas propriedades de solubilidade em 24h de imersão em água e do teor de umidade absorvido em 24h em atmosfera controlada em 75% de umidade relativa.

Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 18, sendo possível verificar que a adição de ácido tânico reduz significativamente a solubilidade dos filmes, sendo verificada uma redução de cerca de 15% para a amostras PG-5ATe PG-10AT, de 28% para o filme PG-15AT e de 74% para o filme PG-20AT. Além disto, ocorreu uma redução de 15% para o

filme PG-10AT, 24% para o filme PG-15AT e em 29% para o filme PG-20AT na absorção de umidade. Os resultados de solubilidade estão apresentados graficamente na Figura 37 para facilitar a visualização.

Tabela 18 - Resumo das propriedades de interação com a água

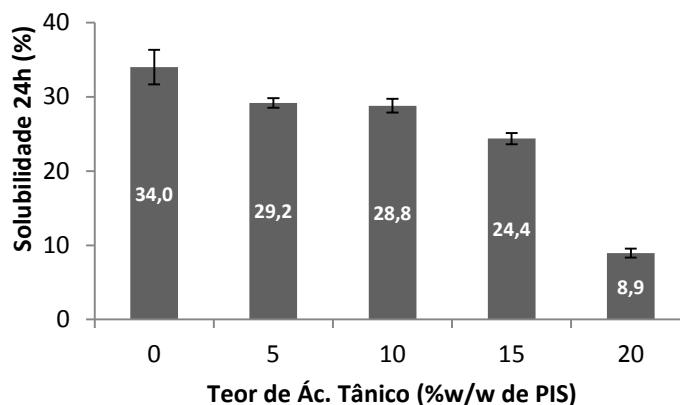
Filme	Solubilidade 24h a 30°C (%)	Teor de umidade a 24h em 75% UR (%)
PG-C	34,0 ± 2,31 ^a	16,0 ± 0,46 ^a
PG-5AT	29,2 ± 0,64 ^b	15,5 ± 0,70 ^{ab}
PG-10AT	28,8 ± 0,94 ^b	13,6 ± 1,22 ^{bc}
PG-15AT	24,4 ± 0,77 ^c	12,2 ± 0,12 ^{cd}
PG-20AT	8,9 ± 0,59 ^d	11,3 ± 0,38 ^d

*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

A solubilidade dos filmes teve uma redução significativa com o aumento do teor de ácido tânico, sendo esta reduzida de 34% no filme controle para 8,9% para o filme com adição de 20% de ácido tânico, redução de 74%, este resultado indica que ocorreu a formação de pontos de reticulação que reduziram a disponibilidade da cadeia da proteína para interagir com a água. Este fato é corroborado pela redução da umidade absorvida pelos filmes à medida que se aumentou o teor do ácido tânico.

Resultados semelhante foram obtidos por Picchio *et al.* (2018) na adição do ácido tânico em filmes de caseína, Hager *et al.* (2012) adicionando ácido tânico a filmes de glúten do trigo, Rivero *et al.* (2010) adicionando ácido tânico a uma matriz de quitosana e Insaward *et al.* (2015) que adicionou diferentes ácido fenólicos a filmes de proteína de soja. Todos os autores citados relacionaram este efeito à formação de ligações cruzadas entre as cadeias da PIS e o ácido tânico (HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012; INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015; PICCHIO *et al.*, 2018a; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010b).

Figura 37 – Resultados do ensaio de solubilidade em 24h a 30°C



Insaward *et al.* (2015) relatou ainda que a redução da solubilidade e tendência a formação de ligações cruzadas entre compostos fenólicos e a cadeia da PIS está

diretamente relacionada com o aumento do número de hidroxilas apresentadas pelo ácido. Desta forma, verifica-se o alto potencial a formação de reticulações do ácido tânico, visto que este possui um alto número de moléculas de ácido gálico que contem três hidroxilas em sua estrutura (INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015).

Propriedades mecânicas

A possibilidade de aplicação de filmes produzidos a base de produtos naturais está diretamente relacionada à sua resistência mecânica, visto que a embalagem deve suportar as tensões normais encontradas durante sua aplicação, transporte, armazenamento e manuseio subsequentes dos produtos, sendo que esta exigência dependerá de cada aplicação. A resistência a estas tensões para filmes de proteína depende, principalmente, dos tipos e densidades das interações intermoleculares (ligações dissulfeto, hidrofóbicas e de hidrogênio) na rede de proteína, ou seja, a formação de ligações cruzadas tende a alterar as propriedades mecânicas dos polímeros (HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012).

Sendo assim, como foi relatado anteriormente que a adição de ácido tânico induz a reticulação dentro da estrutura da PIS, sugere-se que ocorrerá também um aumento da resistência mecânica dos filmes. Os dados apresentados na Tabela 19 corroboram com esta suposição, visto que o aumento do teor de ácido tânico elevou a tensão na ruptura dos filmes e reduziu sua elongação.

Tabela 19 - Propriedades mecânicas das amostras contendo ácido tânico

Filme	t (μm)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PG-C	64,3 \pm 7,11	2,34 \pm 0,22 ^b	171,4 \pm 6,07 ^{bc}
PG-5AT	63,3 \pm 3,33	3,21 \pm 0,38 ^{ab}	287,0 \pm 43,7 ^a
PG-10AT	81,7 \pm 8,33	3,11 \pm 0,25 ^{ab}	176,1 \pm 12,5 ^b
PG-15AT	77,3 \pm 4,33	3,12 \pm 0,55 ^{ab}	132,7 \pm 20,5 ^c
PG-20AT	91,0 \pm 5,20	3,54 \pm 0,38 ^a	32,1 \pm 1,47 ^d

*Valores são médias \pm desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Para os filmes com baixo teor de ácido tânico adicionado pode-se verificar que ocorreu um pequeno aumento da tensão na ruptura sem redução da elongação dos filmes, sendo que para o teor de 5% pode-se observar até uma elevação desta propriedade e um aumento de cerca de 37% na tensão na ruptura. Um comportamento semelhante foi relatado por Rivero *et al.* (2010) avaliando as propriedades mecânicas de filmes de quitosana com ácido tânico. Os autores atribuíram isto a um efeito de reforço ocasionado por uma baixa densidade de ligações cruzadas (RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010b).

As alterações no comportamento mecânico se mostraram estatisticamente significativas para a amostra contendo 20% de ácido tânico, com uma elevação de cerca de 50% na tensão na ruptura, mas uma significativa redução na elongação do filme. Como sugerido também pelos resultados de solubilidade, esta amostra foi a que apresentou

maior densidade de ligações cruzadas, o que pode explicar este comportamento. Além disto, pode-se observar que as alterações nas propriedades mecânicas (elevação da tensão e redução da alongação) acompanharam a elevação da espessura dos filmes.

Resultados semelhantes foram obtidos por vários autores como Rivero *et al.* (2010), estudando a reticulação de filmes de quitosana, Picchio *et al.* (2018), estudando o efeito do ácido tânico em filmes de caseína, Hager *et al.* (2012) avaliando a reticulação em filmes de glúten do trigo e Wang *et al.* (2017) em filmes de PIS. Todos os autores atribuíram este comportamento a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos –OH e –NH₂ das proteínas com o grupo –OH do ácido tânico, além da formação de interações não-covalentes e covalentes. Hager *et al.* (2012) e Wang *et al.* (2017) também observaram uma elevação na espessura dos filmes com o aumento da densidade de reticulação (HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012; PICCHIO *et al.*, 2018a; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010b; WANG *et al.*, 2017).

Levando-se em conta os resultados obtidos no presente capítulo e considerando que as estratégias avaliadas neste trabalho objetivaram para a redução da hidrofiliabilidade e solubilidade em água dos filmes de PIS plastificados com glicerol, avaliou-se como ideal a utilização de cerca de 20% de ácido tânico. Embora a extensibilidade do filme tenha sido prejudicada, a alta densidade de reticulações formadas neste filme, confirmadas pelos estudos do FTIR e TGA, possibilitou uma redução significativa da solubilidade dos filmes. Em trabalhos futuros, sugere-se estudar qual o teor entre 15 e 20% apresenta o melhor balanço de propriedades. É interessante ressaltar que, mesmo com sua alongação reduzida o filme ainda pode ser aplicado em embalagens que não exijam altos valores desta propriedade, visto que existem materiais hoje já melhor estabelecidos industrialmente como o PLA e o PCL que apresentam baixas alongações na ruptura. (GONZÁLEZ; ALVAREZ IGARZABAL, 2013; HONG *et al.*, 2009) Desta forma, na fase seguinte deste trabalho o teor de ácido tânico utilizado será de 20%.

5.2.3 Fase C - Estudo da interação dos diferentes aditivos

Na Etapa II-C será estudada a interação entre os óleos de coco e linhaça, no teor de 3% conforme definido ao final da Etapa II-A e o ácido tânico no teor de 20% conforme definido na etapa II-B.

Como demonstrado no capítulo 5.2.1 os óleos apresentaram efeitos significativos sobre a absorção de umidade, reduzindo esta e apresentaram fortes interações com a cadeia da proteína, modificando significativamente suas propriedades mecânicas. Estas interações se mostraram mais intensas para o óleo de linhaça. O ácido tânico, por sua vez, mostrou apresentar potencial de reticulação da cadeia da proteína alterando significativamente sua solubilidade, absorção de umidade, propriedades mecânicas e térmicas.

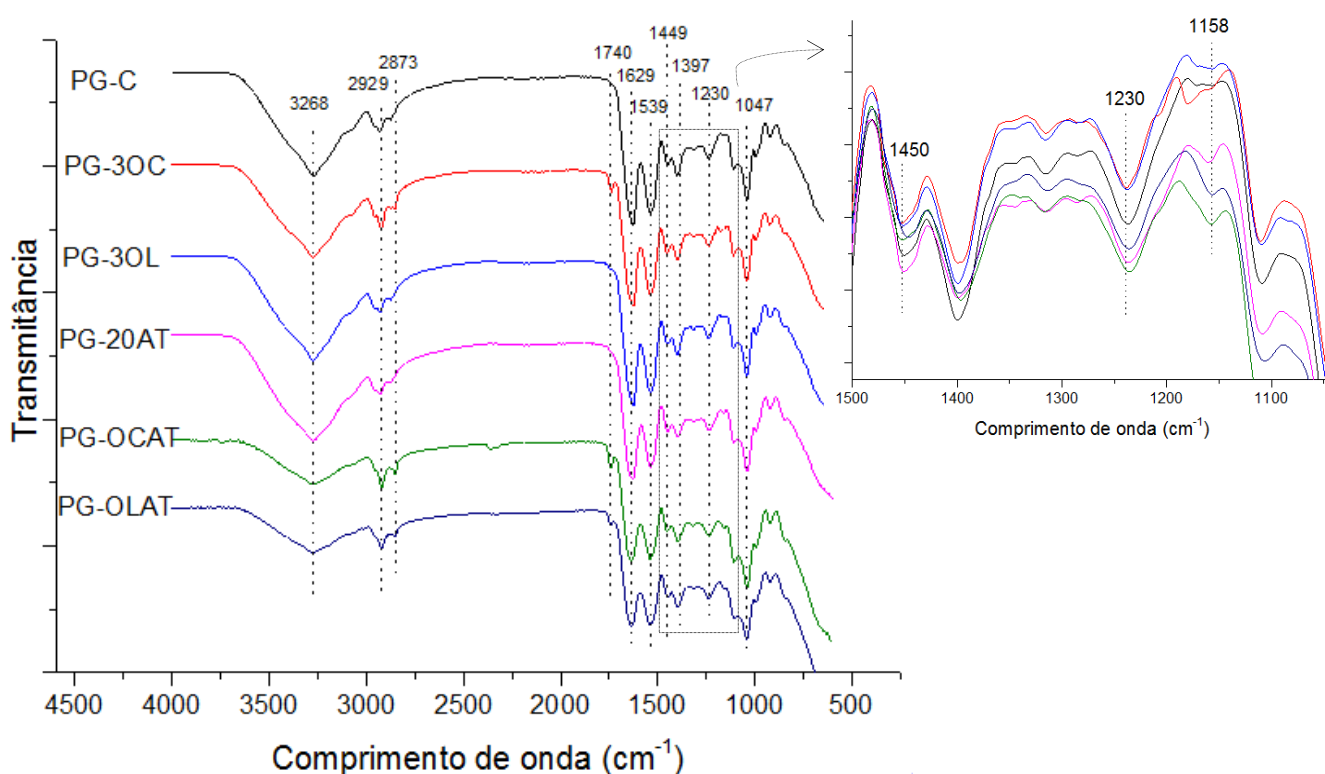
Com a mistura de ambos os agentes busca-se avaliar se ocorrerão efeitos sinérgicos que possibilitem uma melhora nas propriedades de interação com a água, além da modificação das demais propriedades. Para isto serão avaliados os espectros de FTIR, o comportamento térmico, as micrografias de superfície, a coloração dos filmes, a solubilidade, absorção de umidade e propriedades mecânicas das amostras. A fim de

avaliar os efeitos tanto dos filmes com a mistura quanto dos filmes contendo 3% dos óleos e 20% do ácido tânico serão também avaliadas a degradação quando expostas ao solo das amostras e a toxicidade destas.

Espectroscopia de absorção no infravermelho

Neste capítulo serão estudadas as interações ocorridas entre a PIS, os óleos de coco e linhaça e o ácido tânico, para isto será utilizada a técnica de FTIR-ATR, os espectros para estes componentes puros foram apresentados nas Etapas II-A e II-B. Na Figura 38 são apresentados os espectros dos filmes PG-OCAT e PG-OLAT assim como os espectros do filme controle, dos filmes contendo 3% dos óleos e do filme contendo 20% de ácido tânico. É possível verificar que os filmes contendo a mistura dos óleos com o agente reticulante são semelhantes ao filme controle apresentando os picos referentes a amidas I, II e III em 1628 cm^{-1} , 1530 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} e as bandas referentes às ligações C-C e C-O do glicerol entre 850 e 1110 cm^{-1} .

Figura 38 - Espectros de FTIR para os filmes avaliados.



A presença dos picos em 2929 e 2873 cm^{-1} e a redução dos picos em 3268 cm^{-1} enquanto ainda aparecem os picos característicos das amidas I e II nos espectros dos filmes PG-OCAT e PG-OLAT, sugere que existem interações entre a cadeia dos óleos e da proteína por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas mesmo com a presença do ácido tânico (CARPINÉ et al., 2015; WANG et al., 2014).

No entanto, observa-se a presença do pico referente a C=O dos óleos em 1740 cm^{-1} nos espectros referentes aos filmes com a mistura dos dois agentes estudados, sendo este mais pronunciado para o filme contendo óleo de coco do que para o filme contendo óleo de linhaça, o que sugere que nem todas as ligações C=O dos óleos foram quebradas

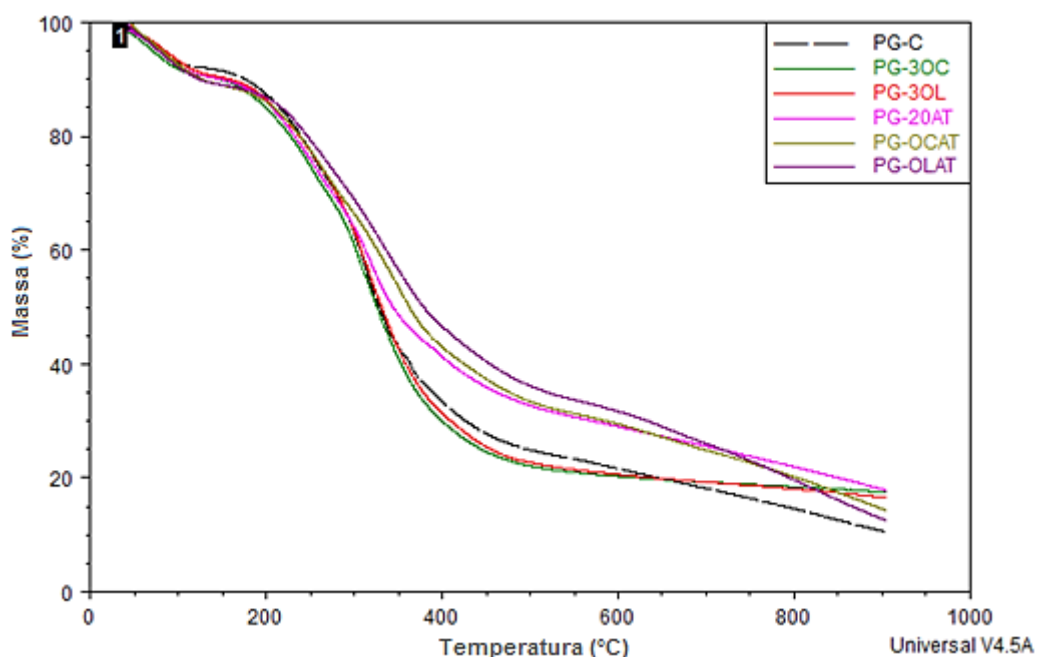
e interagiram com a cadeia da proteína (GUERRERO et al., 2011; YE et al., 2019). Como não se verifica nos espectros dos filmes PG-OCAT e PG-OLAT a presença dos picos referentes ao C=O e C=C do ácido tânico, pode-se sugerir que a cadeia da proteína interagiu com este componente, esta interação mais forte com o agente reticulante pode ter reduzido a forte interação anteriormente apresentada com o óleo de linhaça, por exemplo (NOVAC; LISA; BALAITA, 2009; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010a).

Além disto, pode-se verificar que mesmo com a presença dos óleos a formação de reticulações por meio de ligações covalentes entre o ácido tânico, oxidado em o-quinona, e a cadeia da proteína seguem ocorrendo, pois ainda é possível observar, na ampliação dos espectros apresentada na Figura 38, um aumento nos picos 1450 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} se comparados ao filme controle e a formação do pico em 1155 cm^{-1} , sugerindo a formação de ligações C-N e C-N-C conforme sugerido na avaliação dos espectros com ácido tânico (INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015; QUAN et al., 2019; SMITH 2019).

Análise Termogravimétrica

Para avaliar o efeito da adição conjunta dos óleos vegetais e do ácido tânico na estabilidade térmica de filmes de proteína isolada de soja, neste capítulo serão apresentados os dados obtidos na técnica de TGA. Com este intuito são apresentadas na Figura 39 as curvas de TG para os filmes contendo a adição conjunta de ambos os óleos estudados com o ácido tânico, as curvas de TG dos filmes contendo apenas os óleos ou o ácido tânico e a curva referente à amostra controle. É possível verificar que a adição conjunta dos óleos com o ácido tânico elevou a estabilidade térmica dos filmes se comparado ao filme controle e aos filmes contendo os aditivos separadamente.

Figura 39 - Curvas de TG para os filmes avaliados



Para facilitar a avaliação deste comportamento, na Figura 40 são apresentadas as curvas de DTG para as amostras PG-OCAT e PG-OLAT em comparação com a curva de DTG

do filme controle, e na Tabela 20 é possível avaliar os dados de temperatura em diferentes perdas de massa, dados referentes aos eventos de degradação apresentados e o resíduo obtido a 950°C.

A degradação dos filmes contendo ambos os aditivos em conjunto também apresentaram os três eventos principais de degradação apresentados pelos demais filmes, sendo o primeiro referente à evaporação de água, o segundo a degradação do glicerol e o terceiro associado à degradação das cadeias proteicas (GUERRERO et al., 2011; LI et al., 2016; YE et al., 2019).

Figura 40 – Curvas de DTG para a amostra controle e para as amostras: a) PG-OCAT e b) PG-OLAT

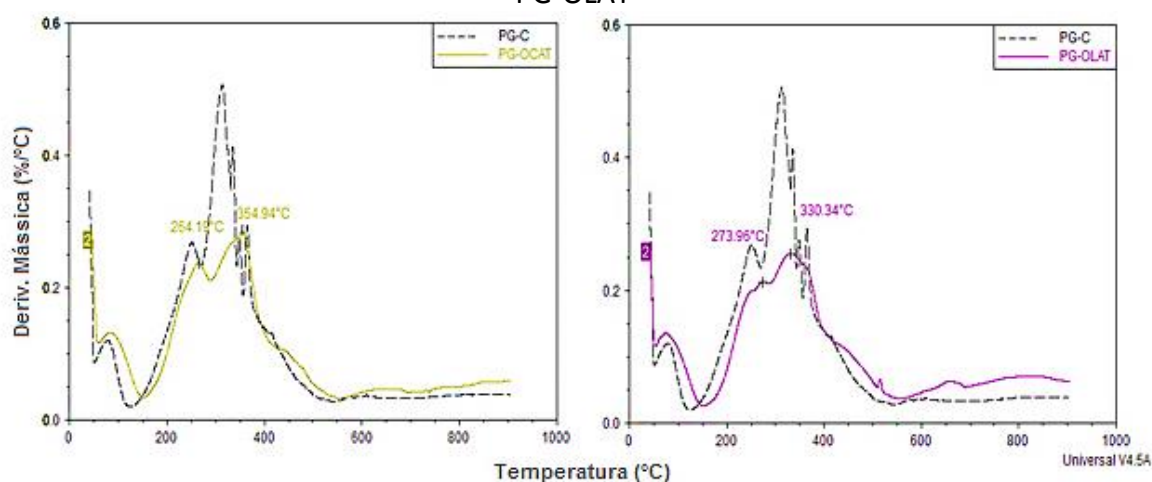


Tabela 20 – Dados obtidos dos termogramas das amostras avaliadas na Etapa II-C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B

Amostra	Temperatura de perda de massa em diferentes percentuais (°C)			Dados referentes aos principais picos da DTG				Resíduo a 950°C (%)
	15%	30%	50%	$T_{p_{gli}}$ (°C)	%m	$T_{p_{pis}}$ (°C)	%m	
PG-C	215,0	279,5	328,2	251,1	20,2	313,4	61,4	10,5
PG-3OC	198,8	269,4	325,5	250,9	20,4	305,3	52,9	17,4
PG-3OL	209,3	280,3	331,1	252,8	16,9	317,8	41,5	16,6
PG-20AT	205,9	275,5	344,0	253,3	21,0	319,3	51,4	17,9
PG-OCAT	208,2	283,0	362,6	264,2	20,5	354,9	53,9	14,4
PG-OLAT	216,7	294,9	378,6	274,0	18,0	330,3	58,2	12,6

Verificando-se as temperaturas onde ocorrem 50% de perda de massa para os filmes avaliados, observa-se que estas apresentaram um aumento significativo se comparado às apresentadas para o filme controle, indo de 328°C na PG-C para 362°C para a amostra PG-OCAT e para 378,6 °C para a amostra PG-OLAT. Estas se mostraram superiores também as temperaturas apresentadas para os filmes contendo apenas os óleos ou o ácido tânico. Além disto, é possível verificar que as temperaturas dos picos onde ocorre a degradação do glicerol e da cadeia da PIS também foram significativamente elevadas. Estes efeitos sugerem que os filmes apresentam estabilidade térmica superior e podem indicar ter ocorrido um efeito sinérgico entre as interações sofridas pela proteína com ambos os

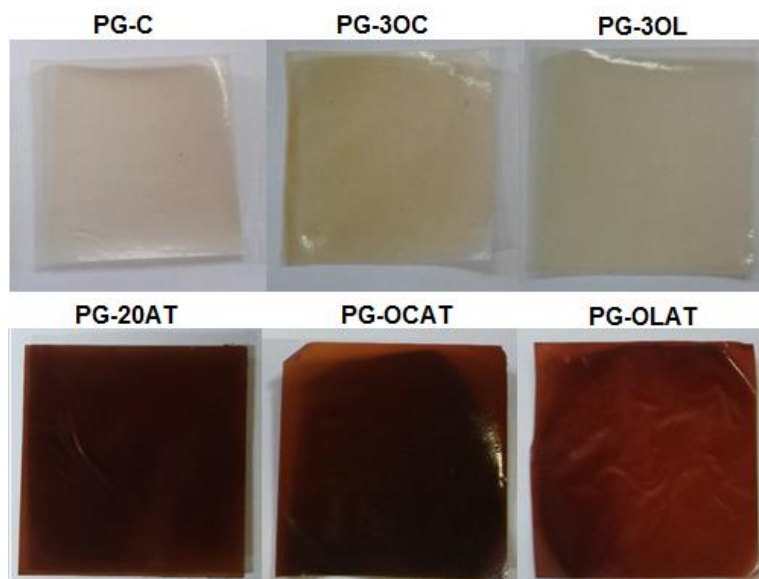
aditivos, o que pode ser confirmado pela análise de FTIR apresentada anteriormente (GUERRERO et al., 2011; INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015; NOVAC; LISA; BALAITA, 2009; PICCHIO et al., 2018a; YE et al., 2019).

É interessante observar que, embora ocorra em menor proporção, ainda é possível verificar uma interação entre a cadeia lipídica do óleo de linhaça e o glicerol, demonstrada na curva de DTG para os filmes contendo apenas o óleo, visto que é possível verificar a presença de um ombro próximo ao pico referente à degradação do glicerol e que a massa perdida neste é inferior aos 20% adicionados de plastificante. (GUERRERO et al., 2011; YE et al., 2019)

Aspecto Visual

O aspecto dos filmes obtidos com a mistura dos óleos e do ácido tânico pode ser visualizado na Figura 41, assim como a amostra controle e as amostras contendo os aditivos isoladamente para meio de comparação. Os filmes PG-OCAT e PG-OLAT apresentaram-se lisos, homogêneos e com boa manuseabilidade. Estes apresentaram características de coloração semelhantes ao filme contendo 20% de ácido tânico.

Figura 41 – Fotografia dos filmes avaliados

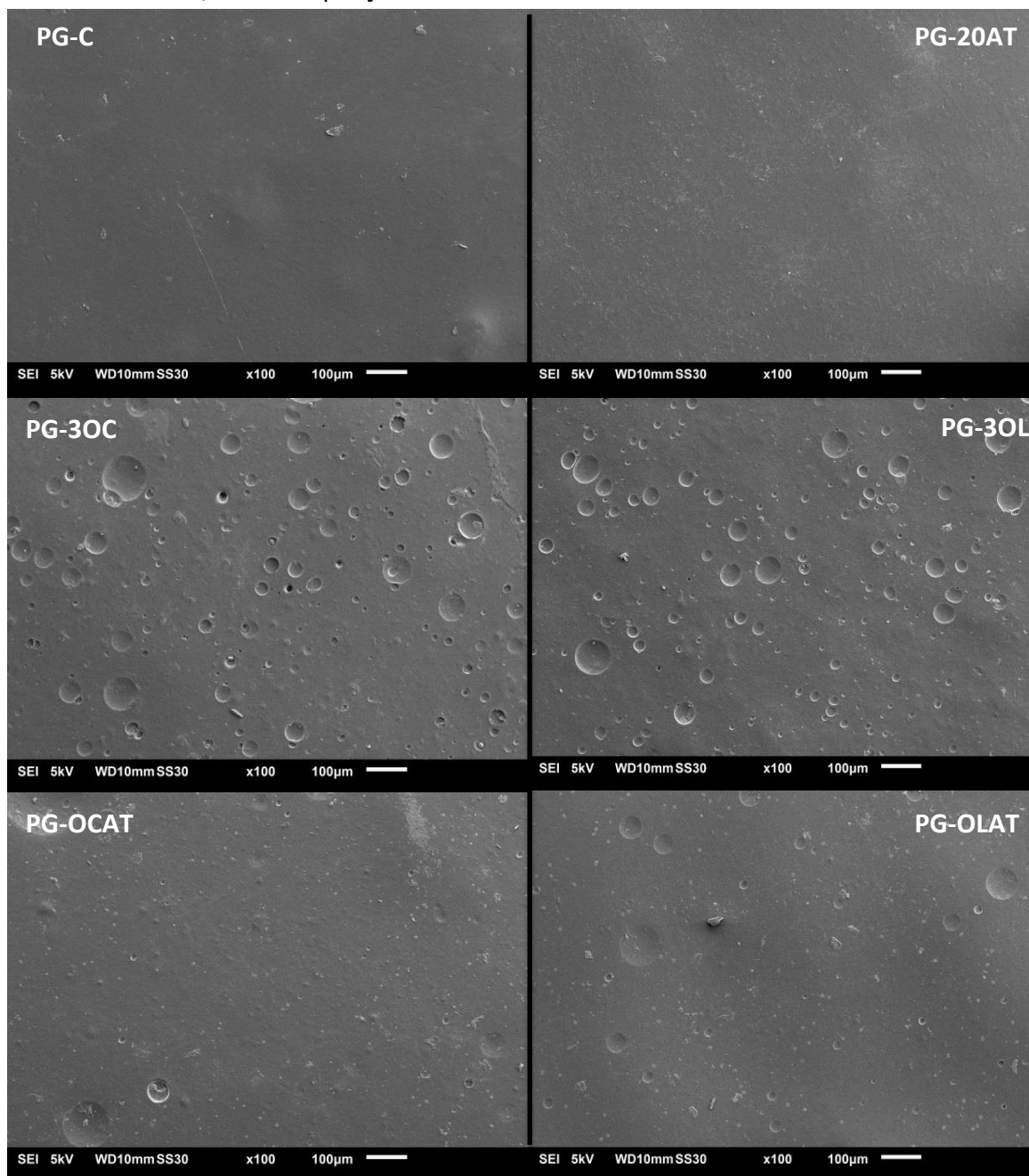


Qualitativamente não é possível verificar diferenças significativas na homogeneidade dos filmes, logo para melhor verificação desta propriedade na Figura 42 são apresentadas as microscopias de superfície, para os filmes avaliados.

Avaliando as micrografias podemos observar que o filme contendo ácido tânico tem um aspecto mais próximo do filme controle, sendo observadas apenas algumas pequenas partículas que podem ser atribuídas ao ácido. Já a superfície dos óleos não apresentou partículas, mas apresentou um grande número de bolhas, sendo estas maiores para o filme contendo óleo de coco que para o com óleo de linhaça, esta formação de bolhas é característica da mistura de óleos vegetais em uma matriz proteica quando não se utiliza um surfactante (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2011; WANG; YIN; PADUA, 2008).

Quanto aos filmes PG-OCAT e PG-OLAT verifica-se que a adição do composto fenólico juntamente com os óleos reduziu a formação de bolhas na superfície, formando assim a formação de filmes com menor porosidade. Este efeito poderia sugerir que o AT estaria aumentando à interação entre a proteína e os óleos, agindo como um compatibilizante.

Figura 42 - Micrografias da superfície dos filmes PG-C, PG-20AT, PG-30C, PG-30L, PG-OCAT e PG-OLAT, 5kV e ampliação de 100x



Resultados semelhantes foram obtidos por Arcan *et al.* (2014) que estudou a incorporação de ácido oleico e catequina, um composto fenólico, em filmes de zeína. Os autores observaram que a adição do composto fenólico modificou significativamente a morfologia dos filmes reduzindo sua porosidade, presente devido à alta formação de bolhas próprias da zeína e do ácido graxo adicionado. Este efeito foi atribuído à alta

capacidade de formação de ligações de hidrogênio da catequina com os grupos carbonila presentes na estrutura da zeína (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2014).

Para a verificação das modificações ocorridas na coloração dos filmes, foi realizado o ensaio de colorimetria. Os dados obtidos neste ensaio estão apresentados na Tabela 21, para facilitar a comparação são novamente apresentados os dados para os filmes com 3% dos óleos e 20% de ácido tânico. Como verificado na análise visual, a coloração destes se mostrou diferente da amostra controle e mais próxima da amostra PG-20AT.

Tabela 21 - Propriedades óticas e de cor das amostras avaliadas na Etapa II-C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B

<i>Filme</i>	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>Brilho</i>	<i>Opacidade</i>
PG-C	85,5 ± 1,34 ^a	-0,51 ± 0,13 ^c	15,2 ± 0,78 ^b	55,2 ± 6,90 ^{ab}	26,1 ± 0,76 ^d
PG-3OC	82,1 ± 0,17 ^{ab}	-1,26 ± 0,01 ^c	19,0 ± 0,58 ^a	55,9 ± 6,01 ^a	31,5 ± 3,07 ^{cd}
PG-3OL	80,9 ± 0,13 ^b	-0,65 ± 0,05 ^c	20,1 ± 0,17 ^a	41,2 ± 0,83 ^{bc}	35,5 ± 1,75 ^c
PG-20AT	32,8 ± 0,83 ^c	14,2 ± 0,77 ^b	11,4 ± 1,30 ^b	60,0 ± 1,90 ^a	58,1 ± 1,86 ^b
PG-OCAT	29,5 ± 1,33 ^c	15,4 ± 1,23 ^b	10,3 ± 1,67 ^b	34,5 ± 6,19 ^c	90,9 ± 1,34 ^a
PG-OLAT	31,7 ± 2,53 ^c	17,9 ± 1,74 ^a	11,7 ± 2,23 ^b	37,9 ± 2,15 ^c	93,1 ± 3,97 ^a

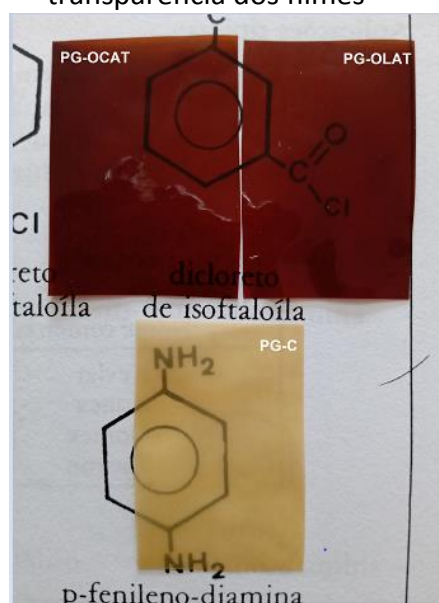
*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey (p < 0,05), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

Os dados apresentados demonstram que a coloração dos filmes PG-OCAT e PG-OLAT foi bem próxima à obtida pelo filme PG-20AT, o que pode ser explicado pela coloração do ácido tânico adicionado. Para a amostra PG-OLAT, observamos que ocorre um maior avermelhamento da amostra, devido ao aumento do parâmetro a, o que possivelmente se deve a coloração amarelo-alaranjada do óleo de linhaça (HOPKINS et al., 2015b; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010a).

Os valores obtidos para opacidade foram mais altos que os apresentados para as demais amostras, o que pode ser atribuído a um efeito sinérgico entre os óleos e o ácido tânico, visto que a adição de ambos ocasiona elevação da opacidade dos filmes, conforme discutido nas Etapas II-A e II-B (BERTAN et al., 2005; INSAWARD; DUANGMAL; MAHAWANICH, 2015; WANG et al., 2014, 2017). No entanto, como se pode verificar na Figura 43 os filmes continuaram apresentando transparência.

Já o brilho destas foi reduzido, o que pode ser explicado pelo maior aparecimento de partículas de ácido tânico na superfície das amostras, o que pode ser visualizado nas microscopias da Figura 42. As partículas podem ter elevado a rugosidade, reduzindo o brilho das amostras já que esta propriedade é dependente da rugosidade superficial, como já demonstrado na Etapa I-A (GUERRINI et al., 2004).

Figura 43 – Fotografia dos filmes PG-OCAT, PG-OLAT e PG-C sobre o texto para verificar a transparência dos filmes



Propriedades de Interação com a água

Com a comprovação nos capítulos anteriores do potencial tanto dos óleos estudados como agentes hidrofóbicos quanto do ácido tânico como reticulante da cadeia da proteína faz-se interessante avaliar as propriedades de interação com a água dos filmes com a utilização em conjunto destes aditivos para avaliar a possibilidade de existência de um possível efeito sinérgico entre estes. Desta forma, neste subcapítulo serão discutidas as propriedades de solubilidade em água em 24h a 30°C e de absorção de umidade neste mesmo período em ambiente com umidade relativa de 75% para os filmes contendo a mistura de ambos os aditivos estudados. Os dados obtidos nestes ensaios podem ser visualizados na Tabela 22, onde se verifica que os filmes apresentaram redução tanto da solubilidade quanto da absorção de umidade se comparados ao filme controle e que um efeito sinérgico foi verificado na amostra PG-OLAT para o resultado de absorção de umidade.

Tabela 22 - Resumo das propriedades de interação com a água na Etapa II-C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B

<i>Filme</i>	<i>Solubilidade 24h a 30°C (%)</i>	<i>Absorção de umidade em 24h a 75% UR (%)</i>
PG-C	35,4 ± 2,62 ^a	16,0 ± 0,46 ^a
PG-3OC	24,4 ± 0,85 ^b	12,7 ± 0,81 ^{ab}
PG-3OL	22,4 ± 0,47 ^b	12,2 ± 0,99 ^b
PG-20AT	8,9 ± 0,59 ^c	11,1 ± 0,62 ^b
PG-OCAT	9,7 ± 0,76 ^c	11,2 ± 1,75 ^b
PG-OLAT	9,5 ± 1,21 ^c	6,64 ± 1,40 ^c

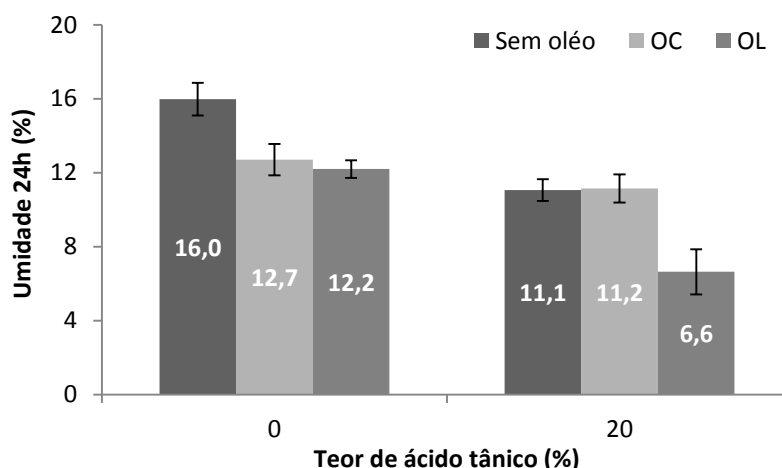
*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey (p < 0,05), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

A adição dos óleos em conjunto com o ácido tânico reduziu a solubilidade se comparado às amostras controle e com adição apenas dos óleos, no entanto estas foram estatisticamente iguais ao resultado obtido para o filme contendo 20% de ácido tânico. Este efeito sugere que as reticulações formadas por este aditivo são o efeito dominante sobre a redução da solubilidade e que a adição dos óleos não interfere significativamente nesta propriedade. Este efeito era esperado, visto que a formação de ligações cruzadas, principalmente as ligações covalentes, tem como principal benefício um aumento da estabilidade da cadeia (AZEREDO; WALDRON, 2016; HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012; PICCHIO et al., 2018b; RIVERO; GARCÍA; PINOTTI, 2010a). Como os óleos apresentaram apenas interações mais fracas estas não tiveram efeito sobre a propriedade de solubilidade.

Quanto à absorção de umidade, o óleo de coco apresentou comportamento igual estatisticamente ao filme contendo ácido tânico, o que sugere o mesmo efeito citado anteriormente de que as interações mais fortes entre o ácido tânico e a proteína tiveram maior influência sobre a propriedade estudada. Já para o filme contendo óleo de linhaça em conjunto com o composto fenólico, verificou-se uma significativa redução da absorção de umidade em comparação a todas as demais amostras, sendo esta cerca de 40% menor do que o valor obtido para o filme contendo apenas ácido tânico e cerca de 60% menor que para o filme controle. Pode-se explicar este fato pela ocorrência de um efeito sinérgico entre as interações ocorridas entre o ácido tânico e a cadeia da proteína e entre esta e o óleo de linhaça. Estes resultados podem ser melhor visualizados na Figura 44 onde são apresentados graficamente.

O comportamento observado para a absorção de umidade sugere que as reticulações da cadeia da proteína não são o efeito dominante, tendo as interações entre o óleo de linhaça e a proteína também agido sobre esta propriedade. Como as principais interações ocorridas entre o óleo e a cadeia da proteína foram de ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, estas possivelmente impedem que novas moléculas de água interajam com a proteína. Com a adição conjunta dos aditivos ocorreu um efeito sinérgico que possibilitou uma maior redução da absorção de umidade neste filme (HOPKINS et al., 2015b; YE et al., 2019).

Figura 44 – Resultados de absorção de umidade para as amostras com e sem a adição dos óleos e diferentes teores de ácido tânico



Pode-se ainda verificar com este comportamento que, embora a análise de FTIR tenha sugerido uma redução da interação do óleo com a proteína quando adicionado em conjunto com o ácido tânico, as interações entre os óleos e a proteína ainda estão presentes. E, como sugerido também pela análise de FTIR na Etapa II-A, as interações entre o óleo de linhaça e a cadeia da proteína são mais fortes que as para o óleo de coco, o que pode explicar o fato de que neste último não ocorreu esta redução da absorção de umidade.

Propriedades mecânicas

A adição tanto dos óleos avaliados quanto do ácido tânico ocasionou modificações das propriedades mecânicas dos filmes, sendo que ambos apresentaram elevação da tensão na ruptura, sendo esta mais elevada para os óleos, e redução da flexibilidade dos filmes, sendo este efeito mais pronunciado para os filmes contendo ácido tânico.

Desta forma, espera-se um comportamento semelhante para filmes com a mistura de ambos os aditivos. Para verificação deste fato foi realizado o ensaio de resistência à tração nos filmes obtidos nesta etapa. Um resumo dos resultados obtidos, juntamente com os resultados para o filme controle e para os demais padrões com os óleos e com o ácido tânico pode ser visualizado na Tabela 23.

Tabela 23 - Propriedades mecânicas das amostras avaliadas na Etapa II – C em comparação com as amostras selecionadas nas Etapas II-A e II-B

<i>Filme</i>	<i>t (μm)</i>	<i>σ_b (MPa)</i>	<i>ε_b (%)</i>
PG-C	64,3 ± 7,11	3,07 ± 0,96 ^c	168,4 ± 6,1 ^a
PG-3OC	74,2 ± 5,83	9,27 ± 1,12 ^b	117,3 ± 30,8 ^b
PG-3OL	64,0 ± 7,2	13,1 ± 2,98 ^a	67,9 ± 15,5 ^{bc}
PG-20AT	91,0 ± 5,20	3,47 ± 0,55 ^c	32,1 ± 1,5 ^{cd}
PG-OCAT	103,7 ± 9,69	7,50 ± 0,73 ^b	25,7 ± 6,1 ^d
PG-OLAT	103,1 ± 13,4	7,48 ± 1,80 ^b	90,2 ± 22,6 ^b

*Valores são médias ± desvio padrão de cada formulação. As diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo Teste de Tukey (p < 0,05), sendo que as letras iguais em uma mesma coluna indicam que não há diferença significativa com 95 % de confiança.

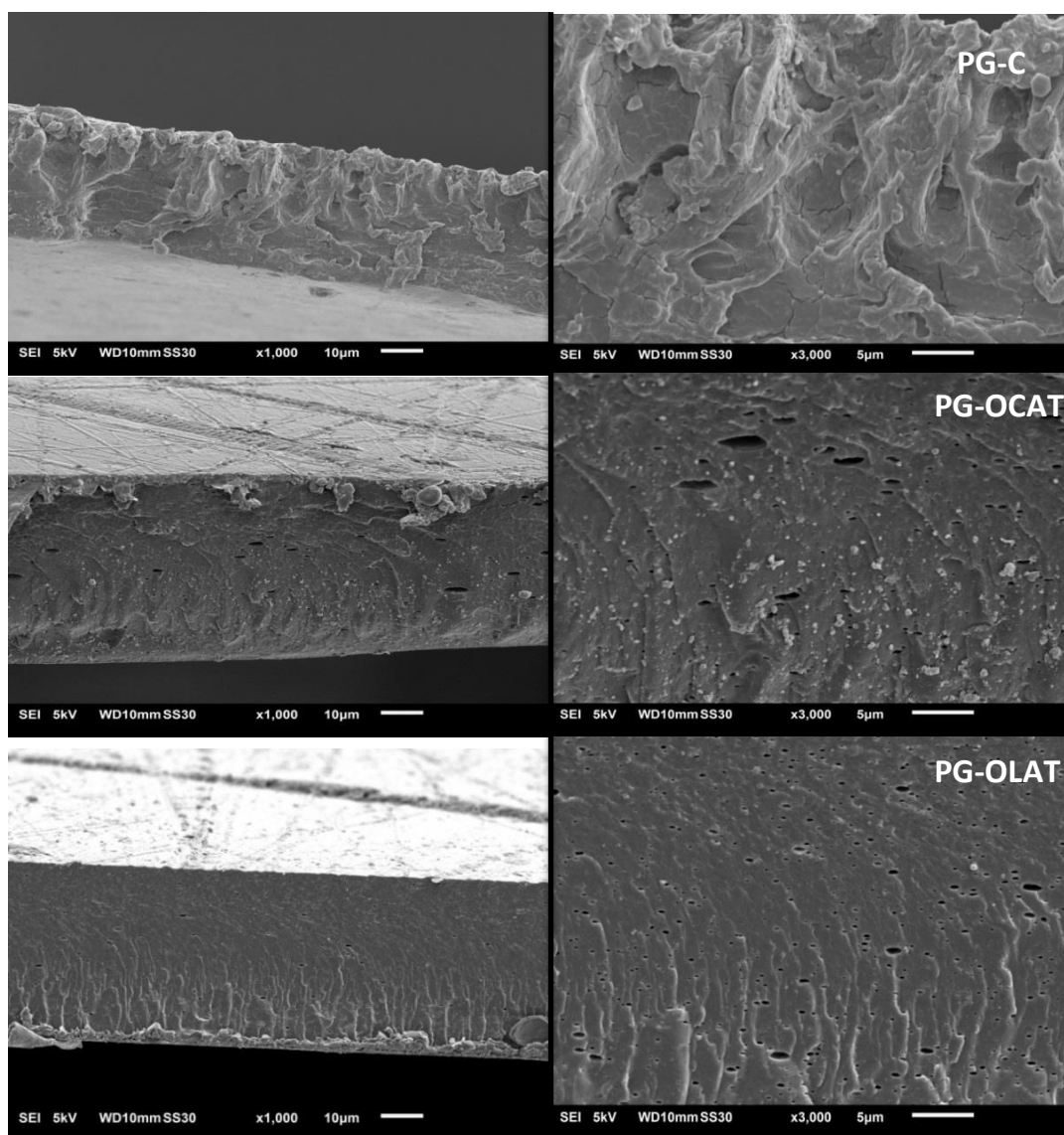
Verifica-se que os filmes apresentaram tensão na ruptura superior ao filme controle e ao filme contendo ácido tânico. Para o filme PG-OCAT a tensão na ruptura foi cerca de 145% maior que o filme controle e 116% maior que o valor de tensão obtido para o filme PG-20AT. Estatisticamente os valores foram semelhantes aos obtidos para o filme contendo apenas óleo de coco (PG-3OC). Já para o filme PG-OLAT, a tensão na ruptura foi cerca de 200% maior que a obtida para o filme controle e cerca de 170% maior que a obtida para o filme PG-20AT, no entanto esta propriedade foi reduzida em cerca de 30% se comparado ao valor obtido para o filme contendo apenas o óleo de linhaça (PG-3OL).

Quanto à elongação dos filmes, a amostra contendo óleo de coco apresentou resultados semelhantes aos obtidos para o filme com adição de 20% do agente reticulante o que demonstra que, como as interações entre o óleo de coco e a proteína não se mostraram tão intensas esta propriedade foi influenciada principalmente pelas

reticulações formadas na cadeia da proteína com o ácido tânico. Já para o filme com o óleo de linhaça ocorreu um aumento da elongação, passando de 32% no filme PG-20AT para 90,2% no filme PG-OLAT, aumento de cerca de 180%. Este efeito pode sugerir que com a redução das interações entre o óleo de linhaça e a proteína devido a presença do ácido tânico, o óleo agiu também como um agente plastificante, visto que a porcentagem de elongação foi maior que para a amostra contendo apenas este óleo.

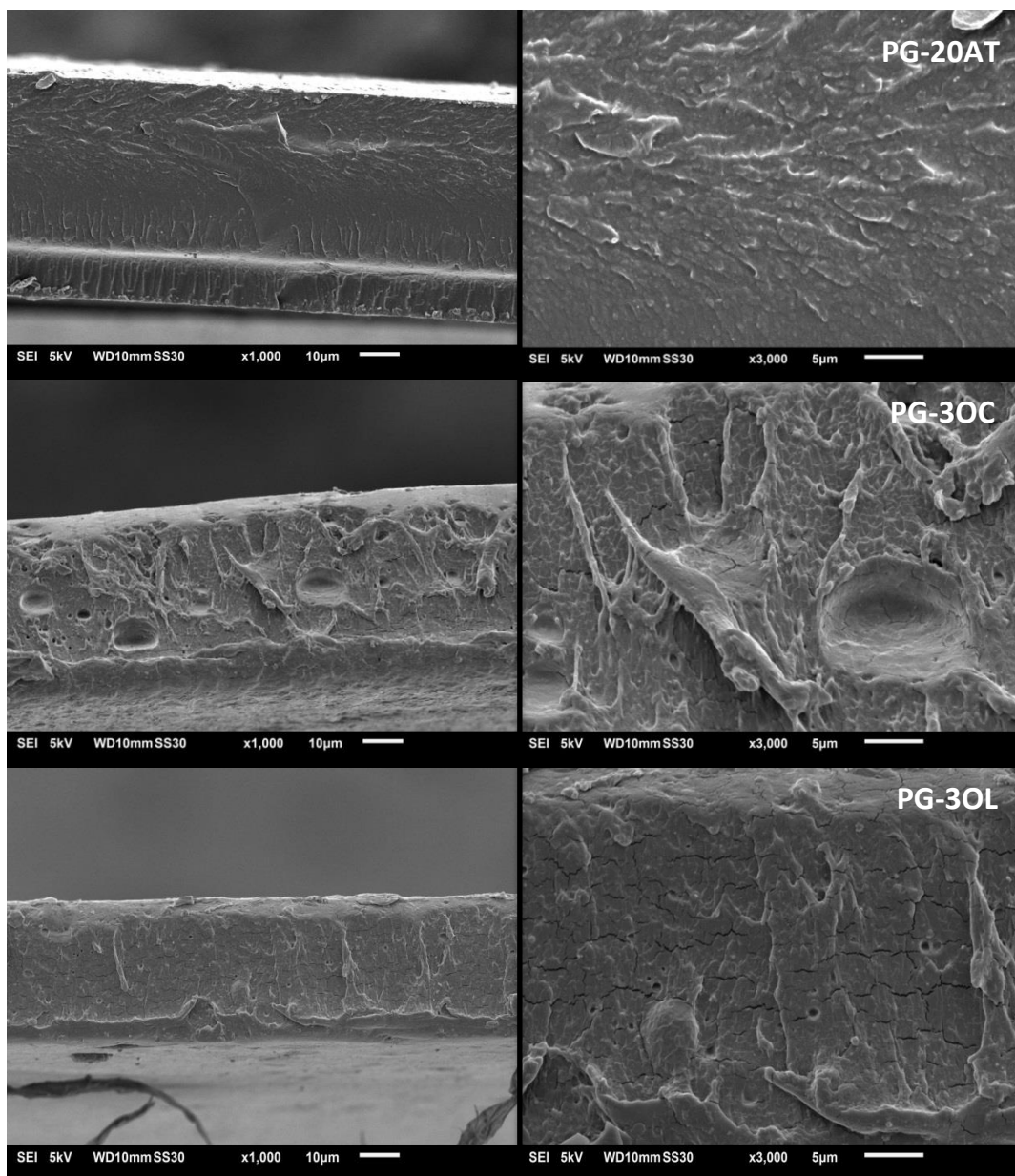
Na Figura 45 é possível verificar as micrografias da superfície de fratura dos filmes aqui avaliados, PG-C, PG-OCAT e PG-OLAT. Os filmes com a adição dos aditivos isoladamente estão apresentados na Figura 46, para facilitar a comparação entre as micrografias. As fraturas foram provocadas fragilizando a amostra com nitrogênio líquido. Para a amostra controle é possível verificar que a fratura ocorrida tem características de fratura dúctil o que possivelmente é proporcionado pela adição do plastificante glicerol, visto que a fratura de filmes obtidos apenas com a PIS é descrita como frágil na literatura (BOŽIČ et al., 2015; WOOL; SUN; SUN, 2005a).

Figure 45 – Micrografias da superfície de fratura para o filme controle e para os filmes com a adição dos óleos de coco (OC) e linhaça (OL) em conjunto com o ácido tânico, 5Kv e ampliações de 1000x na coluna da esquerda e de 3000x na da direita



É possível observar que os filmes obtidos com a adição de ácido tânico e dos óleos apresentaram características de fratura mais próximas à fratura frágil se comparadas ao filme controle e aos filmes contendo apenas os óleos. No entanto, se observarmos o filme PG-20AT na Figura 46 verificamos que com a presença dos óleos o tipo de fratura se tornou mais dúctil, o que concorda com os resultados de tração apresentados, visto que este filme apresentou características de um material frágil (baixa elongação) devido ao alto número de pontos de reticulação (HAGER; VALLONS; ARENDT, 2012; PICCHIO et al., 2018a; WANG et al., 2017).

Figura 46 - Micrografias da superfície de fratura para os filmes contendo ácido tânico, óleos de coco e óleo de linhaça, 5Kv e ampliações de 1000x na coluna da esquerda e de 3000x na da direita



Pode-se observar que a presença do óleo de coco fez com que mais partículas de ácido tânico surgissem na superfície e que, embora as bolhas tenham sido reduzidas na superfície, estas se mostraram mais presentes na seção transversal dos filmes contendo

ácido tânico e os óleos do que nos filmes contendo estes aditivos separadamente. Apesar disto, estas se mostraram menores. O aumento do número de bolhas pode ser devido a menor interação dos óleos com a cadeia da proteína na presença de ácido tânico.

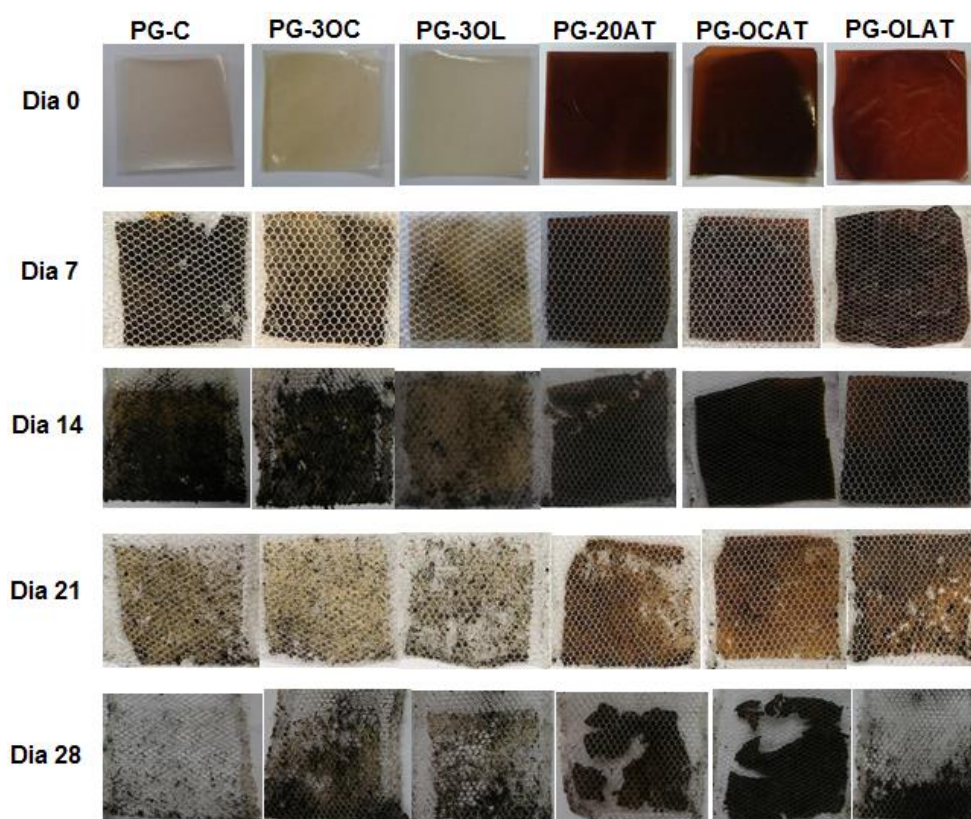
As fraturas dos filmes contendo apenas os óleos se mostraram mais dúcteis se comparadas aos filmes contendo ácido tânico e um pouco mais frágeis que o filme controle, sendo que este efeito é mais pronunciado para o filme contendo óleo de linhaça. O comportamento apresentado nas fraturas concorda com os resultados obtidos nos ensaios de resistência a tração (HOPKINS et al., 2015b).

Estudo da biodegradação

Sendo a proteína isolada de soja um material natural, espera-se que filmes formados por esta sejam naturalmente biodegradáveis. No entanto, quando modificações físicas e químicas são realizadas nestes filmes podem ocorrer modificações na biodegradabilidade dos materiais. Desta forma, nesta etapa buscou-se avaliar possíveis modificações na degradação por meio de micro-organismos devido às reticulações formadas entre os agentes modificadores utilizados e a cadeia da proteína.

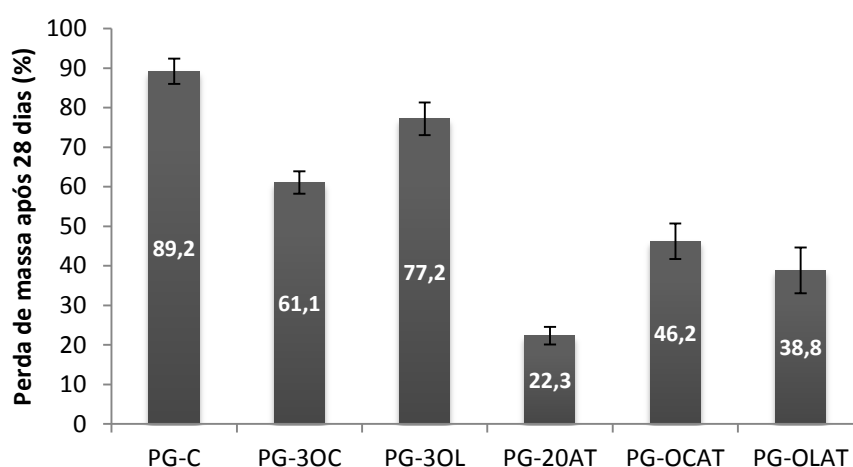
Para isto foi utilizada uma metodologia baseada na Norma ASTM G 160 – 03, onde as amostras foram enterradas em solo oriundo de compostagem, obtido comercialmente, e foram desenterradas com diferentes tempos de exposição. Para simplificação foram avaliadas apenas a perda de massa final e a análise visual qualitativa das amostras. Na Figura 47 podem-se observar os filmes antes e nos diferentes tempos de exposição ao solo e pode-se inferir que as ligações formadas pelos aditivos adicionados não modificaram sua biodegradabilidade, mas adiaram o tempo em que ocorre a degradação.

Figura 47 – Imagens cronológicas da biodegradação das amostras estudadas



É possível verificar que, no final dos 28 dias o filme contendo apenas PIS e glicerol já havia sido praticamente todo consumido, os filmes contendo os óleos ainda apresentaram algumas partículas pequenas, já os filmes contendo o agente ácido tânico apresentaram ainda cerca de 50-80% da sua massa após os 28 dias. A porcentagem de perda de massa de cada amostra pode ser visualizada no gráfico da Figura 46, onde são apresentadas as perdas de massa das amostras após os 28 dias enterradas. No entanto, mesmo ainda apresentado uma porcentagem de massa significativa, é possível verificar que os filmes contendo o ácido tânico já perderam sua integridade física, estando fragmentados após os 28 dias de exposição ao solo.

Figura 48 – Perda de massa após 28 dias enterradas para as amostras dos filmes avaliados



Resultados semelhantes foram obtidos por Picchio *et al.* (2018) em filmes de caseína com a adição de ácido tânico, estes também verificaram que embora os filmes contendo o aditivo iniciaram a perder sua integridade física estes levaram mais tempo para se degradar que os filmes livres do aditivo que se degradaram em 7 dias. Os autores sugeriram que este efeito é devido à presença de reticulações na cadeia dos filmes que aumentam sua resistência e estabilidade (PICCHIO *et al.*, 2018a). É possível observar que a presença dos óleos nos filmes contendo o ácido tânico acelerou a degradação, o que pode ser explicado pelo aumento de matéria orgânica nestes filmes.

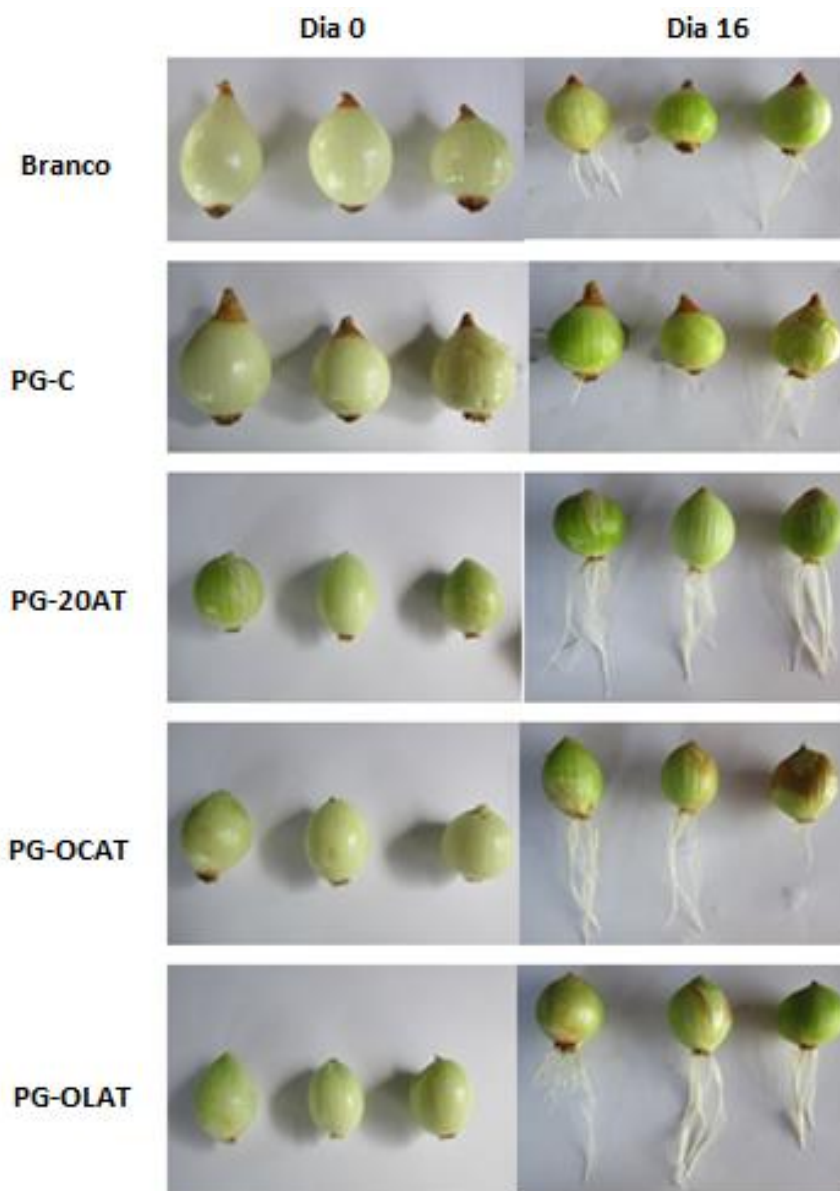
Estudo da toxicidade

Neste capítulo buscou-se avaliar uma possível modificação da toxicidade dos filmes produzidos devido à adição do agente reticulante natural ácido tânico, pois este, sendo um composto fenólico, poderia apresentar algum nível de toxicidade em altas concentrações. Como o teor utilizado de AT para possibilitar uma redução significativa da sua solubilidade é de 20%, se faz interessante avaliar se a compostagem dos filmes produzidos com este agente podem interferir no crescimento das plantas. Para isto, utilizou-se uma simplificação do método *Allium Cepa*, que avalia o crescimento de cebolas, da espécie que nomeia o ensaio, em uma solução contendo algum contaminante, esta espécie é utilizada por ter crescimento rápido em meio aquoso e por

ser sensível a diversos contaminantes podendo apresentar variações no crescimento e forma das raízes (FERNÁNDEZ FREIRE et al., 2016). Neste estudo vamos avaliar apenas o crescimento das raízes.

Na Figura 49 são apresentadas fotografias das cebolas antes de serem colocadas em contato com as soluções e após 16 dias de germinação. Já na Figura 50 é apresentada a porcentagem de crescimento das raízes em relação ao crescimento do branco, que continha apenas água sem nenhum tratamento. Em ambas é possível verificar o efeito dos filmes no crescimento das raízes das cebolas.

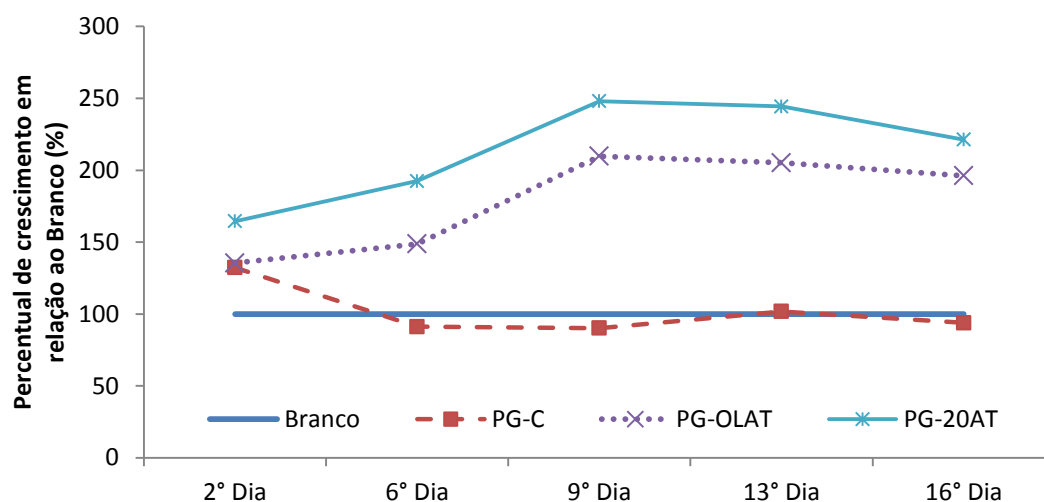
Figura 49 – Aspecto das cebolas no dia 0 e após 16 dias germinando em soluções contendo os filmes avaliados.



A partir da análise qualitativa das raízes, sugere-se que a adição do agente ácido tânico sozinho ou com a adição dos óleos, não interferiu no crescimento das raízes após 16 dias de germinação destas. Observando o gráfico apresentado na Figura 50 pode-se chegar à mesma conclusão. Como a taxa de crescimento foi calculada em relação ao branco este representou a porcentagem de 100% de crescimento, raízes que cresceram

mais, apresentaram valores maiores de 100%. Estes dados demonstram que, inclusive, as raízes que germinaram na solução contendo os filmes que possuíam o agente avaliado cresceram mais do que as raízes que estavam em contato apenas com a água e que o filme com a PIS pura.

Figura 50 – Percentual de crescimento das cebolas germinadas nas soluções contendo os filmes em relação ao branco



É interessante ressaltar que os filmes contendo ácido tânico não se dissolveram após os 16 dias submersos em água, já o filme contendo apenas a PIS e o glicerol se dissolveu nos primeiros dias de experimento. Moura (2019) sugere que o aumento da matéria orgânica na solução que pode agir como um fertilizante auxiliando o crescimento das raízes (Moura A. S., 2019). No entanto, existe um limite de nutrientes para que isto ocorra, acima deste o crescimento da planta é dificultado (Faria *et al.*, 2007). Isto pode explicar o porquê de o crescimento para as cebolas que estavam nas soluções contendo o filme PG-C não foi tão intenso quanto para as demais amostras.

No trabalho de Picchio *et al.* (2018), no qual foi realizado um estudo do efeito da adição do mesmo composto fenólico em filmes de caseína, também foi observado que as amostras contendo ácido tânico não possuíam toxicidade elevada, sugerindo que o uso desta para reticulação de filmes biodegradáveis é seguro. Os autores estudaram ainda o efeito citotóxico dos filmes avaliados e concluíram que o uso dos filmes é seguro para contatos com alimentos, pois não ocorre transferência significativa do extrato estudado (PICCHIO *et al.*, 2018a).

6 Conclusões

No presente trabalho foram desenvolvidos e caracterizados filmes biodegradáveis a base de proteína isolada de soja (PIS) utilizando o glicerol como agente plastificante e aditivos como o óleo de coco, o óleo de linhaça e o ácido tânico para modificar as propriedades do filme desenvolvido. Estudou-se os parâmetros de processamento utilizados, o efeito do plastificante e a influencia dos aditivos nas propriedades dos filmes desenvolvidos. As conclusões obtidas com este estudo são apresentadas a seguir.

Foi possível obter filmes homogêneos e com boas propriedades a partir da metodologia avaliada. Verificou-se que o tempo de mistura e a temperatura de processamento apresentam influência significativa sobre as propriedades dos filmes, sendo que a temperatura se mostrou o parâmetro mais significativo dentre os avaliados. Neste estudo a temperatura de 75°C e o tempo de mistura de 60 minutos foram definidas como ideais.

O glicerol apresenta bom desempenho como plastificante em filmes á base de PIS, reduzindo a rigidez destes. No entanto, em teores elevados, acima de 20%, este aditivo eleva a hidrofiliçidade dos filmes.

Os óleos de coco e de linhaça apresentaram características de agentes hidrofóbicos reduzindo a solubilidade e absorção de umidade dos filmes. Neste estudo os teores ótimos tanto de OC quanto de OL foi de 3% em massa de PIS. Verificou-se que estes apresentaram interações com a cadeia da proteína, por meio de ligações hidrofóbicas e de hidrogênio, o que ocasionou a elevação da resistência mecânica dos filmes, sendo este efeito mais pronunciado para o óleo de linhaça, possivelmente pela presença de insaturações na cadeia dos principais ácidos graxos que compõem este.

O ácido tânico demonstrou realmente possuir efeitos como agente reticulante da cadeia da proteína isolada de soja, mostrando bom desempenho na modificação da hidrofiliçidade dos filmes, sendo que, no teor de 20% em massa de PIS, este reduziu significativamente a solubilidade e alterou a absorção de umidade dos filmes. As fortes interações apresentadas entre este e a cadeia da proteína alteraram significativamente as propriedades mecânicas, reduzindo a alongação dos filmes. Os filmes contendo ácido tânico apresentaram um forte escurecimento, o que sugere que estes possam ser aplicados em embalagens para produtos que necessitem de proteção da luz UV.

No estudo das interações entre os óleos e o ácido tânico sugere-se que as interações entre os óleos e a cadeia da proteína foram reduzidas pela presença do ácido tânico, mas que estas se mostraram ainda presentes elevando a estabilidade térmica dos filmes, por exemplo. Para o óleo de coco, ocorreram poucas alterações das propriedades se comparado às obtidas para o filme contendo apenas o ácido tânico, o que sugere que os efeitos das interações do agente reticulante com a proteína foram dominantes sobre as propriedades dos filmes. Já para o óleo de linhaça foi possível verificar um efeito sinérgico entre as propriedades apresentadas pelo óleo e pelo ácido tânico quando utilizados separadamente, obtendo-se uma redução significativa da absorção de umidade dos filmes se comparado à obtida nos filmes contendo apenas o óleo ou o reticulante. Além disto, a redução entre as interações do óleo com a PIS, verificada pela análise de FTIR, permitiu que as cadeias deste que não interagiram com a PIS agissem como um

plastificante, levando a uma elevação simultânea da resistência a tração e da flexibilidade dos filmes.

Com o estudo da biodegradação das amostras com os aditivos em seus teores ótimos foi possível verificar que as reticulações formadas entre a cadeia do ácido tânico e a proteína prolongaram o tempo de vida dos filmes, embora não tenham alterado sua biodegradabilidade.

Com o teste *Allium Cepa* verificou-se que os filmes não apresentam toxicidade para o crescimento das plantas, descartando a presença de toxicidade por conta do teor elevado de ácido tânico utilizado.

Por fim, os resultados obtidos sugerem que a metodologia avaliada apresenta potencial para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de PIS com foco no setor de embalagens. Verificando que tanto os óleos como o ácido tânico apresentam potencial para aumentar a hidrofobicidade dos filmes e elevar sua estabilidade física e térmica. A utilização em conjunto do ácido tânico com o óleo de linhaça permite a obtenção de propriedades superiores devido ao efeito sinérgico e complementar obtido da mistura destes em filmes de proteína, sendo esta, a formulação contendo 20% de ácido tânico e 3% de óleo de linhaça, escolhida como ideal neste trabalho.

7 Sugestões para trabalhos futuros

Para possibilitar uma melhor compreensão das interações entre os materiais estudados neste trabalho e para possibilitar a aplicação deste industrialmente seguem algumas sugestões para trabalhos futuros:

- A realização de estudos mais completos sobre as interações ocorridas entre o OL e a PIS;
- A avaliação do ponto ótimo entre 15 e 20% de AT em que seja apresentado um equilíbrio entre a redução da solubilidade e da alongação dos filmes;
- Estudar a utilização de AT com teores mais altos de plastificantes, para avaliar o efeito sobre a alongação dos filmes;
- Estudar formas de reduzir a opacidade dos filmes contendo AT;
- Estudar formas de processamento contínuo, para viabilizar a produção industrial dos filmes.

8 Referências

ABIPLAST. Perfil 2016. s.l. : Associação Brasileira da Indústria do Plástico, 2016.

ANDREUCCETTI, C. C.; GALICIA-GARCÍA, R. A.; MARTÍNEZ-BUSTOS, T., GROSSO, C.R.F.. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 129–136, 2011.

Aplicada, Instituto de Pesquisa. Instituto de pesquisa Aplicada. [ipea.gov.br](http://www.ipea.gov.br) [Online] Instituto de Pesquisa Aplicada, 25 de 01 de 2017. [Citado em: 30 de 01 de 2020.] Disponível em: http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=29296&catid=1&Itemid=7.

ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 550–556, 2011.

ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Controlled release properties of zein-fatty acid blend films for multiple bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 32, p. 8238–8246, 2014.

ATARÉS, L.; DE JESUS, C.; TALENS, P.; CHIRALD, A.. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 384–391, 2010. a.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: Thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 111–122, 2004.

AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, p. 109–122, 2016.

BALAGUER, M. P., BORNE, M.; CHALIER, P., GONTARD, N.; MOREL, M.H.; PEYRON, S.; GAVARA, R.; HERNANDEZ-MUNOZ, P.. Retention and release of cinnamaldehyde from wheat protein matrices. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1493–1502, 2013.

BERTAN, L. C.; Fakhouri, F.M.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F.. Influence of the addition of lauric acid to films made from gelatin, triacetin and a blend of stearic and palmitic acids. **Macromolecular Symposia**, [s. l.], v. 229, p. 143–149, 2005.

BIGI, A., COJAZZI, G., PANZAVOLTA, S., RUBINI, K.. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde cross-linking. **Biomaterials**, 22 (8), 763–768, 2001.

BINSI, P. K.; RAVISHANKAR, C. N.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Development and Characterization of an Edible Composite Film Based on Chitosan and Virgin Coconut Oil with Improved Moisture Sorption Properties. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 78, n. 4, 2013.

BOANINI, E.; RUBINI, K.; PANZAVOLTA, S.; BIGI, A..Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 383–388, 2010.

BOŽIČ, M; Majeric, M.; Matja D.; Kokol, V.. Mechanical and barrier properties of soy protein isolate films plasticized with a mixture of glycerol and dendritic polyglycerol. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], 2015.

BRAVIN, B.; PERESSINI, D.; SENSIDONI, A. Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 21, p. 6448–6455, 2004.

BUFFO, R. A.; HAN, J. H. Edible films and coatings from plant origin proteins. **Innovations in Food Packaging**, [s. l.], p. 277–300, 2005.

BUITIMEA-CANTÚA, N. E.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic-protein interactions: Effects on food properties and health benefits. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 188–198, 2018.

CANAPI, E. C.; AUGUSTIN, Y. T. V.; MORO, E. A. PEDROSA, E.; LUZ, J. M.; BENDAÑO, J. Coconut oil. In: SAHIDI, F. (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Edible Oil and Fat Products: Specialty Oils and Oil Products*, v. 2, 6a ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2005, p. 123 – 148.

CARPINÉ, D. **Desenvolvimento e caracterização de filme emulsionado biodegradável produzido a partir de proteína isolada de soja, óleo de coco e surfactantes naturais**. 2015. 112 f. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos - Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 2015.

CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; BERTAN, L. C.; MAFRA, M. R..Development and Characterization of Soy Protein Isolate Emulsion-Based Edible Films with Added Coconut Oil for Olive Oil Packaging: Barrier, Mechanical, and Thermal Properties. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1811–1823, 2015.

CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; ANDRADE, E. F.; BERTAN, L. C.; MAFRA, M. R.. Effect of the natural surfactant *Yucca schidigera* extract on the properties of biodegradable emulsified films produced from soy protein isolate and coconut oil. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], 2016.

CASTILHO-ALMEIDA, E. W.; DOS, H. F. Artigo. [s. l.], v. 35, n. 9, p. 1752–1757, 2012.

CHEN, P.; ZHANG, L. New evidences of glass transitions and microstructures of soy protein plasticized with glycerol. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 237–245, 2005.

CHICK, J.; HERNANDEZ, R. J. Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax-based edible films. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 1073–1079, 2002.

CHO, S. Y.; PARK, J.W.; BATT, H.P.; THOMAS, R. L.. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 418–423, 2007.

CHO, S. Y.; LEE, S. Y.; RHEE, C. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 1234–1239, 2010.

CHOE, E.; MIN, D. B. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 5, p. 169–186, 2006.

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**, [s. l.], 2014.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. **Cereal Chem.**, [s. l.], v. 75, p. 1, 1998.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Edible Films and Coatings for Food Applications. [s.l: s.n.], 2009.

DAMODARAN, S.. Amino acids, peptides and proteins. In S. Damodaran, O. R. Fennema, & K. L. Parkin (Vol. Eds.), **Food chemistry**: Vol. 4, (pp. 217–329), 2008.

DE CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 717–726, 2004.

DEGRUSON, M. L. Biobased Polymer Packaging. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l: s.n.], 2016.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. embrapa.br[Online] Embrapa, junho de 2019. [Citado em 30 de 01 de 2020.] Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>

ERIKSEN, M.; LEBRETON, L.C.; CARSON, H.S.; THIEL, M.; MOORE, C.J.; BORRERRO J.C.; GALGANI, F.; RYAN, P.G., REISSER, J.. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014.

FAKHOURI, F. M.; COSTA P.; YAMASHITA, F.; MARTELLI, S.M.; JESUS, R.C.;ALGANES, K.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; INOCENTINE-MEI, L.H.. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 681–689, 2013.

FARIA, C. M. B.; SILVA, D. J.; MENDES, A. M. S. **Cultivo de Cebola no Nordeste**. nov/2007. 3 ed. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spcebola/adubacao.htm>. [Acesso em: 28 de janeiro 2020.]

FERNANDES NASSAR, S.; DOMBRE, C.; GASTALDI, E.; TOUCHALEAUME, F.; CHALIER, P.. Soy protein isolate nanocomposite film enriched with eugenol, an antimicrobial agent: Interactions and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], 2018.

FERNÁNDEZ FREIRE, P.; PEROPADRE, A.; ROSAL, R.; MARTÍN, J.M.P.; HAZEN, M.J.. Toxicological assessment of third generation (G3) poly (amidoamine) dendrimers using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, [s. l.], v. 563–564, p. 899–903, 2016.

FUKUSHIMA, D. Denaturation of soybean proteins by organic solvents. **Cereal Chem.**, [s. l.], v. 46, p. 156–163, 1969.

GALUS, S. Functional properties of soy protein isolate edible films as affected by rapeseed oil concentration. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], 2018.

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**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 1835–1839, 1993.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, uses, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 5, 2017.

GUILBERT, E. S. G.; SUP, N. Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings St ephane. [s. l.], v. 17, p. 10–17, 1996.

GIOIELLI, L. A. Óleos E Gorduras Vegetais: Composição E Tecnologia, 1996.

GONTARD, N.; MARCHESSEAU, S.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S.. Edible Composite Films of Wheat Gluten and Lipids - Water-Vapor Permeability and Other Physical-Properties. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 39–50, 1994.

GONZÁLEZ, A.; GASTELU, G.; BARRERA, G.N.; RIBOTTA, P.D.; ÁLVAREZ IGARZABAL, C. I..Preparation and characterization of soy protein films reinforced with cellulose nanofibers obtained from soybean by-products. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 89, n. November 2018, p. 758–764, 2019.

GONZÁLEZ, A.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Soy protein - Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], 2013.

GONZÁLEZ, A.; STRUMIA, M. C.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], 2011.

GOYAL, A. SHARMA, V., UPADHYAY, N., GILL, S., & SIHAG, M.. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 1633–1653, 2014.

GRAF, B. A.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 281–290, 2005.

GU, L.; PENG, N., CHANG, C.; MCCLEMENTS, D. J.; SU, Y.; YANG, Y.. Fabrication of Surface-Active Antioxidant Food Biopolymers: Conjugation of Catechin Polymers to Egg White Proteins. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 198–210, 2017.

GUERRERO, P.; RETEGI, A.; GABILONDO, N.; DE LA CABA, K.. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. [s. l.], 2010.

GUERRERO, P.; NUR HANANI Z.A.; KERRY, J.P.; DE LA CABA, K.. Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], 2011.

GUERRINI, L. M.; PAULIN, P.I.F.; BRETAS, R.E.S.. Correlação entre as propriedades reológicas, óticas e a morfologia de filmes soprados de LLDPE/LDPE. **Polímeros**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 38–45, 2004.

HAGER, A. S.; VALLONS, K. J. R.; ARENDT, E. K. Influence of gallic acid and tannic acid on the mechanical and barrier properties of wheat gluten films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 24, p. 6157–6163, 2012.

HAMMANN, F.; SCHMID, M. Determination and quantification of molecular interactions in protein films: A review. **Materials**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 7975–7996, 2014.

HAN, Y.; LI, K.; CHEN, H.; LI, J.. Properties of Soy Protein Isolate Biopolymer Film Modified by Graphene. [s. l.], [s.d.]. MDPI-Polymers. 2017.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 64, n. SUPPL., p. 223–236, 2012.

HONG, S. I., CHOI, W.Y.; CHO, S. Y.; JUNG, S. H.; SHIN, B. W.; PARK, H. J.. Mechanical properties and biodegradability of poly-3-caprolactone/soy protein isolate blends compatibilized by coconut oil. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], 2009.

HOPKINS, E. J., CHANG, C.; LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T.. Effects of flaxseed oil concentration on the performance of a soy protein isolate-based emulsion-type film. **Food Research International**, [s. l.], v. 67, p. 418–425, 2015. a.

INSAWARD, A.; DUANGMAL, K.; MAHAWANICH, T. Mechanical, Optical, and Barrier Properties of Soy Protein Film As Affected by Phenolic Acid Addition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 2015.

JAMBECK, J. R., GEYER, R., WILCOX, C., SIEGLER, T. R., PERRYMAN, M., ANDRADY, A., et al. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, 347(6223), 768–771.

JANJARASSKUL, T.; KROCHTA, J. M. Edible Packaging Materials. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 415–448, 2010.

KANAKIS, C. D.; HASNI, I.; BOURASSA, P.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.G.; TAJMIR-RIAAHI, H. A.. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 1046–1055, 2011.

KARNNET, S.; POTIYARAJ, P.; PIMPAN, V. Preparation and properties of biodegradable stearic acid-modified gelatin films. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 106–110, 2005.

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**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 503–510, 2010.

LANDIM, A. P. M. ; BERNARDO, C. O.; MARTINS, I. B. A.; FRANCISCO, M. R.; SANTOS, M. B.; MELO, N. R.. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polímeros**, [s. l.], v. 26, n. spe, p. 82–92, 2016.

LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 213–248, 2012.

LEWINSKA, A.; ZEBROWSKI, J.; DUDA, M.; GORKA, A.; WNUK, A. Fatty acid profile and biological activities of linseed and rapeseed oils. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 22872–22880, 2015.

LI, Y.-D. ; ZHENG, J.-B.; WANG, X.-L.; YANG, K.-K.; WANG, Y.-Z. Structure and properties of soy protein/poly (butylene succinate) blends with improved compatibility. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 3157–3164, 2008.

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**, [s. l.], 2016.

LIU, F.; MA, C.; GAO, Y.; MCCLEMENTS, D.J. Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 76–95, 2017.

LLIGADAS, G.; RONDA, J.C.; GALIA, M.; CADIZ, V. Development. Renewable polymeric materials from vegetable oils: A perspective. **Materials Today**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 337–343, 2013.

MAJID, I.; THAKUR, M.; NANDA, V. Biodegradable Packaging Materials. In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. [s.l: s.n.].

MALLÉGOL, J.; LEMAIRE, J.; GARDETTE, J. L. Drier influence on the curing of linseed oil. **Progress in Organic Coatings**, [s. l.], 2000.

MARCUZZO, E.; PERESSINI, D.; DEBEAUFORT, F.; SENSIDONI, A. Effect of process temperature on gluten film properties. **Italian Journal of Food Science**, [s. l.], 2011.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H.; AMIN, I. Chemical properties of virgin coconut oil. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 301–307, 2009. a.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H.; AMIN, I. Antioxidant capacity and phenolic acids of virgin coconut oil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s. l.], v. 60, n. SUPPL. 2, p. 114–123, 2009. b.

MARQUIÉ, C. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 10, p. 4676–4681, 2001.

MARYAM ADILAH, Z. A.; NUR HANANI, Z. A. Storage stability of soy protein isolate films incorporated with mango kernel extract at different temperature. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], 2019.

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**, [s. l.], v. 86, n. 7, p. 1064–1072, 2006.

MEKONNEN, T.; MUSSONE, P., KHALIL, H., & BRESSLER, D. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. **Journal of Materials Chemistry A**, [s. l.], v. 1, n. 43, p. 13379–13398, 2013.

MENZEL, C.; OLSSON, E.; PLIVELIC, T. S.; ANDERSSON, R.; JOHANSSON, C.; KUKTAITE, R.; JÄRNSTRÖM, L.; KOCH, K. Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 270–276, 2013.

MO, X.; SUN, X. Plasticization of soy protein polymer by polyol-based plasticizers. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 197–202, 2002.

MONEDERO, F. M.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 509–515, 2009.

MORILLON, V.; DEBEAUFORT, F.; BLOND, G.; CAPELLE, M.; VOILLEY, A. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 67–89, 2002.

MOURA, A. S. **Desenvolvimento de biocompósitos de polihidroxibutirato reforçados com fibras vegetais: avaliação da degradação e dos impactos ambientais no solo com o uso da ferramenta acv**. 2019. 140 f. Tese de Doutorado em Engenharia - Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande

do Sul, Porto Alegre, 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Estrutura das proteínas. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger. Princípios de Bioquímica. 3 ed. New York: W. H. Freeman & Co, p. 123-158, 2002.

NEVES, A. G. A., VIEIRA, L. Q. Proteínas. In: VIEIRA, E. C., GAZZINELLI, G., MARESGUIA, M. Bioquímica celular e biologia molecular. São Paulo: Atheneu, p.45-76, 1999.

NIE, X.; ZHAO, L.; WANG, N.; MENG, X. Phenolics-protein interaction involved in silver carp myofibrillar protein films with hydrolysable and condensed tannins. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 81, p. 258–264, 2017.

NÖLTING, B.; NÖLTING, B. The three-dimensional structure of proteins. In: **Methods in Modern Biophysics**. [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 1–22.

NOVAC, O.; LISA, Æ. G.; BALAITA, Æ. L. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. [s. l.], p. 1095–1102, 2009.

O'BRIEN, R. D. Fats and oils: Formulating and processing for applications. New York: CRC Press, 2004.

ORTEGA-TORO, R.; JIMÉNEZ, A., TALENS, P., & CHIRALT, A. Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 38, p. 66–75, 2014.

OU, S. ; WANG, Y.; TANG, S.; HUANG, C.; JACKSON, M. G. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate, 2005.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

PARK, S. K.; HETTIARACHCHY, N. S.; WERE, L. Degradation behavior of soy protein-wheat gluten films in simulated soil conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 3027–3031, 2000.

PATAI, S. A. U. L. General and t emeticdl aspects of the COOH and COOR group. [s. l.], 1969.

PÉREZ-GAGO, M. B.; NADAUD, P.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 1034–1037, 1999.

PLASTIC EUROPE, Plastics - The facts 2019. Dusseldorf. 2019. Disponível em: <https://www.plasticseurope.org/application/files/9715/7129/9584/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf> [Citado em: 30 de 01 de 2020.]

PICCHIO, M. L.; LINCK, Y.G.; MONTI, G. A.; GUGLIOTTA, L. M.; MINARI, R.J.; ALVAREZ IGARZABAL, C. I. Food Hydrocolloids Casein fi lms crosslinked by tannic acid for food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 84, n. April, p. 424–434, 2018. b.

QUAN, T. H.; BENJAKUL, S.; SAE-LEAW, T.; BALANGE, A. K.; MAQSOOD, S. Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 91, n. April, p. 507–517, 2019. a.

QUEZADA GALLO, J. A.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 180, n. 1, p. 37–46, 2000.

RAMOS, Ó. L.; REINAS, I.; SILVA, S.; 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**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 110–122, 2013.

RAWEL, H. M.; ROHN, S. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. [s. l.], v. 30, p. 137–150, 2002.

REDDY, N.; YANG, Y. Thermoplastic films from plant proteins, **Journal of Applied Polymer Science**, 2013.

RHIM, J.; MOHANTY, K. A.; SINGH, S. P.; NG, P. K. W. Preparation and Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Soy Protein Isolate and Poly (lactide). [s. l.], p. 3059–3066, 2006.

RIMDUSIT, S.; JINGJID, S., DAMRONGSAKKUL, S., TIPTIPAKORN, S., & TAKEICHI, T. Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 444–455, 2008.

RIVERO, S.; GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A. Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 270–276, 2010. b.

ROCHA, G. O.; FARIAS, M. G. Filmes Compostos Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca e Proteína de Soja. [s. l.], v. 24, p. 587–595, 2014.

SANTACRUZ, S.; RIVADENEIRA, C.; CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 49, p. 89–94, 2015.

SAUCEDO-POMPA, S.; ROJAS-MOLINA, R.; AGUILERA-CARBÓ, A. F.; SAENZ- GALINDO, A.; GARZA de La.; H.; JASSO-CANTÚ, D.; AGUILAR, C. N. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. **Food Research International**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 511–515, 2009.

SEBTI, I.; DELVES-BROUGHTON, J.; COMA, V. Physicochemical Properties and Bioactivity of Nisin-Containing Cross-Linked Hydroxypropylmethylcellulose Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 22, p. 6468–6474, 2003.

SEUNG, Y. C.; RHEE, C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 833–839, 2004.

SMITH, B. C. Organic Nitrogen Compounds III: Secondary and Tertiary Amines, **Spectroscopy**. Volume 34, Issue 5, pg 22–26 [Citado em 15 de janeiro de 2020] Disponível em: <<http://www.spectroscopyonline.com/organic-nitrogen-compounds-iii-secondary-and-tertiary-amines>>

SONG, F.; ZHANG, L.M.; YANG, C.; YAN, L. Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 373, n. 1–2, p. 41–47, 2009.

SONG, F.; TANG, D.-L.; WANG, X.-L. ; WANG, Y.-Z. Biodegradable Soy Protein Isolate-Based Materials : A Review. [s. l.], 2011. a.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of β -Lactoglobulin Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 12, p. 6298–6302, 2000. b.

STUCHELL, Y. M.; KROCHTA, J. M. Enzymatic Treatments and Thermal Effects on Edible Soy Protein Films. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1332–1337, 1994.

SUN, X. S. 9 - THERMAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF SOY PROTEINS. In: WOOL, R. P.; SUN, X. S. B. T.-B.-B. P. and C. (Eds.). Burlington: Academic Press, 2005. p. 292–326.

TIAN, H.; GUO, G.; FU, X.; YAO, Y.; YUAN, L.; XIANG, A. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. [s. l.], 2018. a.

TIAN, H.; GUO, G.; XIANG, A.; ZHONG, W.-H. Intermolecular interactions and microstructure of glycerol-plasticized soy protein materials at molecular and nanometer levels. **Polymer Testing**, [s. l.], 2018. b.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], 2013.

TOWEY, J. J.; DOUGAN, L. Structural examination of the impact of glycerol on water structure. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 116, n. 5, p. 1633–1641, 2012.

TRINETTA, V. Biodegradable Packaging. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l: s.n.], p. 1–2, 2016.

UTSUMI, S.; KINSELLA, J. E. Structure-Function Relationships in Food Proteins: Subunit Interactions in Heat-Induced Gelation of 7S, 11S, and Soy Isolate Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 297–303, 1985.

VALENZUELA, C.; ABUGOCH, L.; TAPIA, C. Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 531–537, 2013.

VAZ, C. M.; VAN DOEVEREN, P. F. N.M.; YILMAZ, G.; DE GRAAF, L. A.; REIS, R.L.; CUNHA, A. M. Processing and characterization of biodegradable soy plastics: Effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 604–610, 2005.

VIEIRA, M. G. A. ; SILVA, M. A. S.; SANTOS, L.O.S.; BEPPU, M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 254–263, 2011.

WANG, Q.; YIN, L.; PADUA, G. W. Effect of hydrophilic and lipophilic compounds on zein microstructures. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 174–181, 2008.

WANG, S.; SUE, H.-J.; JANE, J. Effects of Polyhydric Alcohols on the Mechanical Properties of Soy Protein Plastics. **Journal of Macromolecular Science**, Part A, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 557–569, 1996.

WANG, Z.; ZHOU, J.; WANG, X-X.; ZHANG, N.; SUN, X-X.; MA, Z-S. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the water vapor barrier properties of soybean protein isolate-based oleic acid/stearic acid blend edible films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], 2014.

WANG, Z.; KANGA, H.; ZHANGA, W.; ZHANGA, S.; LI, J. Improvement of interfacial interactions using natural polyphenol-inspired tannic acid-coated nanoclay enhancement of soy protein isolate biofilms. **Applied Surface Science**, [s. l.], 2017.

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**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 292–302, 2013.

WOOL, R. P.; SUN, X. S.; SUN, X. S. THERMAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF SOY PROTEINS. **Bio-Based Polymers and Composites**, [s. l.], p. 292–326, 2005. b.

WU, Q.; ZHANG, L. Properties and structure of soy protein isolate-ethylene glycol sheets obtained by compression molding. **Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], 2001., [s. l.], 2001. b.

XIA, Z.; SINGH, A.; KIRATITANAVIT, W.; MOSURKAL, R.; KUMAR, J.; NAGARAJAN, R. Unraveling the mechanism of thermal and thermo-oxidative degradation of tannic acid. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 605, p. 77–85, 2015.

YAN, E. K.; Cao, H. L.; ZHANG, C.Y.; LU, Q. Q.; YE, Y. J.; HE, J.; HUANG, L. J.; YIN, D.C. Cross-linked protein crystals by glutaraldehyde and their applications. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 33, p. 26163–26174, 2015.

YE, Q.; HAN, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; XIA, C.; LI, J. Bio-based films with improved water resistance derived from soy protein isolate and stearic acid via bioconjugation. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 214, p. 125–131, 2019.

YOU, J.; LUO, Y.; WU, J. Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 12, p. 2581–2587, 2014.

ZHANG, C.; GARRISON, T.F.; MADBOULYD, S. A.; R. KESSLER, M. R. Recent advances in vegetable oil-based polymers and their composites. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 71, p. 91–143, 2017.

ZHANG, H.; MITTAL, G.. Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, 29, 203–220, 2010.