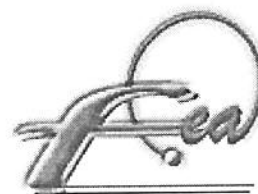




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



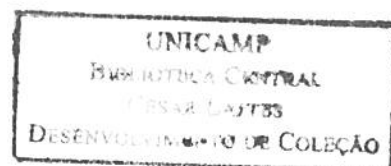
**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS A
BASE DE GELATINA, PLASTIFICANTES HIDROFÓBICOS E SURFACTANTES
NATURAIS**

Autora: Caroline Andreuccetti

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Campinas, 2010





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



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS A
BASE DE GELATINA, PLASTIFICANTES HIDROFÓBICOS E SURFACTANTES
NATURAIS**

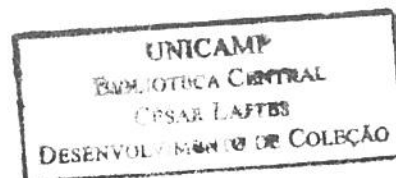
Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutor
em Alimentos e Nutrição.

Autora: Caroline Andreuccetti

Orientador: Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho

Campinas, 2010



UNIDADE EC
Nº CHAMADA _____
T/UNICAMP An25d
V _____
TOMBO BC/ 88624
PROC 16.1342
C _____ D x
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15-10-10
CÓD 'T' 774830

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

An25d Andreuccetti, Caroline
Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de gelatina, plastificantes hidrofóbicos e surfactantes naturais / Caroline Andreuccetti. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Co-orientador: Rosemary Aparecida de Carvalho
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Filmes biodegradáveis. 2. Gelatina. 3. Ésteres de citrato. 4. Surfactantes. 5. Extrusão. I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Carvalho, Rosemary Aparecida de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Development and characterization of gelatin-based biodegradable films, hydrophobic plasticizers and natural surfactants

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biodegradable films, Gelatin, Citrate esters, Surfactants, Extrusion.

Área de concentração: Consumo e Controle de Qualidade

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Theo Guenter Kieckbusch

Fernanda Maria Vanin

Larissa Canhadas Bertan

Classius Ferreira da Silva

Data da defesa: 22/10/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

E₃
R5524

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Caroline Andreuccetti
aprovado pela Comissão Julgadora em 22 / 10 / 10.



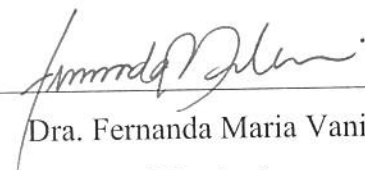
Prof. Dr. Carlos R. E. Grosso
(Orientador)



Prof. Dr. Classius Ferreira da Silva
(Membro)



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch
(Membro)



Dra. Fernanda Maria Vanin
(Membro)

Profa. Dra. Florência Cecília Menegalli
(Membro)

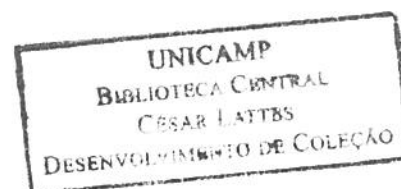
Profa. Dra. Cristiana M. Pedroso Yoshida
(Membro)



Profa. Dra. Larissa Canhadas Bertan
(Membro)

Dra. Patrícia Sayuri Tanada Palmu
(Membro)

201032284



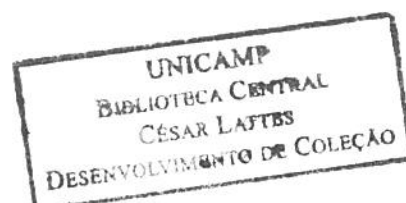
*“Tudo tem seu apogeu e seu declínio... é natural que seja assim;
todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos
o nada, eis que a vida ressurge triunfante e bela!...
Novas folhas, novas flores na indefinida benção do recomeço...!”
(Francisco Cândido Xavier)*

*“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo, mas qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim!”
(Emmanuel – Francisco Cândido Xavier)*

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se
plantou. Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantejar, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-
se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”
(Eclesiastes 3:1-8)*

Dedico esse trabalho a Wladimir e Maria José, meus pais, que me aceitaram como filha, me ensinaram os verdadeiros valores da vida e incondicionalmente me apoiaram em todos os momentos!!!

Todo o meu amor!



AGRADEÇO....

...Ao Prof. Dr. Carlos Grosso, pela orientação firme. Sou muita agradecida pela oportunidade, quando abriu as portas para que eu pudesse fazer o meu Doutorado na FEA. Pela confiança em meu trabalho e por me ajudar a crescer profissionalmente, pelas conversas sinceras e por todo o apoio estendido! Obrigada! Hoje eu entendo e vejo diferente muitas coisas!

...A Prof. Dra. Rosemary de Carvalho, que confiou em mim como pessoa e como profissional, que se tornou um grande exemplo de trabalho! Com a sua orientação, teve grande importância na minha formação, sempre com palavras francas e amigas, ajudou-me em muitos momentos, trazendo-me a realidade e acreditando que eu poderia seguir por esse caminho...Obrigada Rose!

...Ao Prof. Dr. Fernando Martínez-Bustos, pela parceria e pela oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho no Cinvestav – Unidade Querétaro (México).

...Aos membros da banca: Dr. Theo, Dra. Larissa, Dra. Fernanda, Dr. Classius, Dra. Patrícia, Dra. Cristiana e Dra. Florência, pela disponibilidade e pelos valiosos comentários e sugestões que, positivamente, contribuíram muito para a redação final da tese.

...Às queridas amigas do laboratório: Andréa, Gláucia, Alda, Camila, Noemi, Renata, Bárbara e às mais recentes Juliana e Flávia, que tornaram tudo mais fácil e leve, pelos inúmeros cafés na copa, pelas ótimas risadas e experiências trocadas. Àquelas que já seguiram outros caminhos, que tenham sucesso! À Andréa, amiga de todas as horas, obrigada pela lealdade, pela demonstração de fé e pelo convívio durante todos esses anos! Gláucia (Krochta) obrigada pelo carinho amiga, pelos

conselhos e como não podia deixar de ser pela lealdade!

...À amiga Anna Letícia, pelos muitos anos de amizade, obrigada por compartilhar comigo momentos difíceis e alegres, pela compreensão e pelo carinho!

...Aos meus amigos do Grupo Espírita Aprendizes do Evangelho de Barão Geraldo, pelos exemplos de amor, caridade, fé e dedicação nos trabalhos na seara do Mestre. Em especial agradeço a Sandra, Nonô e Frassetto, pelo carinho e amizade!

...As todas as pessoas que conheci no Boldrini, em especial a Luciana e Amanda, e também a todas as crianças, inúmeros rostinhos que fizeram parte da minha jornada em Campinas. Pelo exemplo de perseverança, luta e fé, pela força, alegria e carinho!!!

...Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição: Cidinha, Chico, Fátima, Eliana, Bete, Susana, Lia, Val, D. Marta, D. Sônia, pelo convívio fraterno e alegre, obrigada por todos os serviços prestados! Em especial, agradeço a Yara pelo carinho e cuidado!

...Aos companheiros de caminhada do Departamento de Alimentos e Nutrição: Marianas, Isabele, Isabela, Paula, Aline, Carina, Alessandra, Rafael, Maria Inês e Michele.

...À Dra. Susiley Ciampone pela indicação do uso do extrato de *Yucca schidigera* e sempre pela atenção e respostas prestadas durante o desenvolvimento do trabalho.

...Aos amigos feitos durante minha estadia no México, a todos que me receberam com os corações abertos, proporcionando-me momentos agradáveis e descontraídos. Agradeço a Mara, pela amizade, às meninas Chuy, Amira, Nallely e

Wendy e ao Ricardo, pelo carinho (Hola personas!!!). Aos técnicos Juan, Edmundo, Marcela, Martín, Eleazar, pela ajuda constante nas análises e principalmente pela amizade! Agradeço ao Álvaro pelos cafés, conversas e convívio!

...Ao Tomás, um grande amigo, que dispôs de todo o seu tempo para me auxiliar durante o desenvolvimento do meu trabalho no México. Pelas longas conversas, ensinamentos e pela demonstração de caráter!

...À Fany, que não mediu esforços para que eu me instalasse da melhor forma possível em Querétaro (México), que me fez sentir parte de sua família! Agradeço pela grandeza de coração de toda a sua família, que me abriu as portas de sua casa, dando-me total estrutura durante o tempo que permaneci lá!!

...A Profa Dra. Maria Aparecida Silva (FEQ, UNICAMP), pelo auxílio na realização das análises da curva de sorção de umidade.

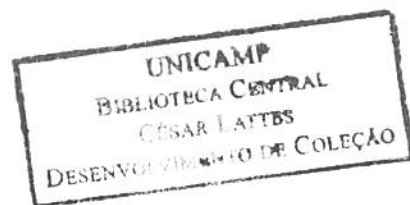
...A Kelly (FEQ, UNICAMP) pelos serviços de microscopia eletrônica de varredura e acima de tudo pela amizade.

...A Mônica Habitante (USP, Pirassununga) pela realização das análises de calorimetria e pelo auxílio no uso do espectrômetro de infravermelho.

...Ao Alexander (Instituto Butantan) pela realização das capturas das imagens de microscopia confocal, pela atenção dedicada e pelo profissionalismo.

...Aos funcionários da secretária de Pós-Graduação, especialmente, ao Cosme e Marcos, sempre pacientes e dedicados!

...A CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.



...A Universidade Estadual de Campinas, a Faculdade de Engenharia Agrícola, pelo início da minha formação e, a Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

...A DEUS Pai pelo dom da minha existência, por ter me proporcionado a realização de mais essa etapa na minha vida e por ter colocado todas essas pessoas queridas no meu caminho, com as quais seguramente não teria chegado até aqui!

A Paz do Mestre!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
RESUMO GERAL.....	xxi
GENERAL ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Objetivos	5
1.2. Estrutura da tese	6
1.3. Referências Bibliográficas	8
CAPÍTULO 2	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Materiais biodegradáveis	13
2.2. Filmes e coberturas biodegradáveis e/ou comestíveis.....	14
2.3. Matérias-primas usadas em filmes biodegradáveis	14
2.3.1. Proteínas	14
2.3.1.1. <i>Gelatina</i>	17
2.3.2. Plastificantes	21
2.3.2.1. <i>Plastificantes hidrofílicos</i>	23
2.3.2.2. <i>Plastificantes hidrofóbicos</i>	24
2.3.3. Surfactante.....	26
2.3.3.1. <i>Lecitina</i>	29
2.3.3.2. <i>Saponinas</i>	31
<i>Yucca schidigera</i>	34
2.4. Processamento de filmes biodegradáveis	36
2.4.1. Adição de substâncias hidrofóbicas	38
2.4.1.1. <i>Filmes bicamadas</i>	38
2.4.1.2. <i>Filmes emulsionados</i>	40
2.4.2. Modificações químicas e/ou enzimáticas	41
2.4.3. Processamento termoplástico	43
2.4.3.1. <i>Extrusão</i>	43
2.4.3.2. <i>Extrusão a sopro</i>	48
2.5. Características e propriedades funcionais de filmes biodegradáveis.....	50
2.5.1. Filmes produzidos por casting	50
2.5.2. Filmes feitos por extrusão.....	57
2.6. Referências Bibliográficas	63
CAPÍTULO 3	79
<i>Effects of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films.....</i>	<i>80</i>
ABSTRACT	80

1. Introduction.....	81
2. Materials and methods.....	83
2.1. Materials	83
2.2. Preparation of biodegradable films.....	83
2.3. Film characterization, visual aspects and thickness	84
2.4. Mechanical properties	85
2.5. Water vapor permeability.....	85
2.6. Opacity	86
2.7. Morphology.....	86
2.7.1. Scanning Electron Microscopy	86
2.7.2. Confocal Laser Scanning Microscopy	87
2.8. Infrared Spectroscopy.....	87
2.9. Experimental design and statistical analysis.....	88
3. Results and discussion	88
3.1. Mechanical Properties	89
3.2. Properties of water vapor barrier	93
3.3. Opacity	95
3.4. Morphology.....	96
3.4.1. Scanning Electron Microscopy	96
3.4.2. Laser Scattering Confocal Microscopy	98
3.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....	100
4. Conclusions.....	103
References.....	103
CAPÍTULO 4	109
<i>Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from Yucca</i> <i>schidigera as the surfactant</i>	<i>110</i>
ABSTRACT	110
1. Introduction.....	111
2. Materials and methods.....	113
2.1. Materials	113
2.2. Preparation of biodegradable films.....	114
2.3. Film characterization, visual aspects and thickness	115
2.4. Mechanical properties	115
2.5. Water vapor permeability.....	115

2.6. Opacity	116
2.7. Water solubility	116
2.8. Emulsion droplets size and film morphology	117
2.8.1. Scanning electron microscopy	117
2.8.2. Confocal Laser Scanning Microscopy	118
2.9. Infrared Spectroscopy.....	118
2.10. Experimental design and statistical analysis.....	119
3. Results and discussion	119
3.1 Mechanical properties	121
3.2 Water vapor permeability.....	123
3.3 Water solubility	127
3.4 Opacity	127
3.5 Size of the emulsion droplets and film morphology	128
3.7 Infrared Spectroscopy.....	134
4. Conclusions.....	135
Acknowledgments.....	136
References.....	136
CAPÍTULO 5	142
<i>Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films.....</i>	<i>143</i>
ABSTRACT	143
1. Introduction.....	144
2. Materials and methods.....	146
2.1. Materials	146
2.2. Preparation of biodegradable films.....	146
2.3. Film characterization, visual aspects and thickness	147
2.4. Mechanical properties	147
2.5. Water vapor permeability.....	148
2.6. Water solubility	148
2.7. Opacity and b* value	149
2.8. Scanning electron microscopy.....	149
2.9. Infrared spectroscopy	150
2.10. X-ray diffraction.....	150
2.11. Experimental design and statistical analysis.....	150

3. Results and discussion	151
3.1. Mechanical properties	151
3.2. Moisture content and water vapor permeability.....	154
3.3. Water solubility	156
3.4. Opacity and b* value	157
3.5. Scanning electron microscopy.....	158
3.6. Infrared spectroscopy	160
3.7. X-ray diffraction.....	162
4. Conclusions.....	164
Acknowledgments.....	165
References.....	165
CAPÍTULO 6	170
<i>Propriedades funcionais de filmes a base de gelatina contendo extrato de Yucca schidigera produzidos por extrusão e casting</i>	<i>171</i>
RESUMO.....	171
1. Introdução.....	172
2. Material e métodos	174
2.1. Material.....	174
2.2. Preparação dos filmes biodegradáveis	174
2.2.1. Processamento termoplástico	175
2.2.2. Casting.....	176
2.3. Caracterização do filme, aspectos visuais e espessura.....	177
2.4. Propriedades mecânicas	177
2.5. Solubilidade em água.....	178
2.6. Microscopia eletrônica de varredura	178
2.7. Calorimetria diferencial de varredura	179
2.8. Espectroscopia de infravermelho	179
2.9. Difração de raios-X	180
3. Resultados e discussão	180
3.1. Filmes extrusados	180
3.2. Filmes produzidos por extrusão e por casting	185
3.2.1. Propriedades mecânicas	185
3.2.2. Solubilidade em água.....	188
3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	188
3.2.4. Calorimetria diferencial de varredura.....	190

3.2.5. Espectroscopia de infravermelho	191
3.2.6. Difração de raios-X.....	193
4. Conclusões.....	196
Referências.....	197
CAPÍTULO 7	205
7. Conclusão geral	206
Anexo I. Visão geral do trabalho e sugestões para pesquisas futuras	212
Referências Bibliográficas	219
Anexo II. Especificações técnicas: plastificantes hidrofóbicos	220
Anexo III. Caracterização dos surfactantes: lecitina de soja e extrato de yucca	221
Anexo IV. Filmes extrusados a base de gelatina e lecitina de soja	222
Material e métodos.....	222
Material	222
Métodos.....	222
Produção dos filmes extrusados	222
Desenho experimental.....	223
Resultados preliminares	223
Propriedades mecânicas.....	225
Umidade	225
Casting x Extrusão	226
Propriedades mecânicas	226
Solubilidade e umidade	226
Curva de sorção de umidade	227
Microscopia eletrônica de varredura.....	228
Temperatura de transição vítrea	229
Espectroscopia de infravermelho	230
Difração de raios-X.....	231
Conclusões.....	233
Agradecimentos	233
Referências Bibliográficas	233
Anexo V. Obtenção de filmes a base de gelatina pela técnica de extrusão-sopro	234
FILMES POR SOPRO	234
Material e métodos.....	234
Material	234
Métodos.....	234

Preparação dos pellets	235
Produção de filmes pela extrusão seguida de sopro.....	235
Obtenção dos filmes tubulares	236
Resultados preliminares	238
Propriedades mecânicas.....	238
Solubilidade e teor de umidade	238
Curva de sorção de umidade	239
Morfologia	239
Temperatura de transição vítrea (Tg).....	240
Espectroscopia de infravermelho.....	242
Difração de raios-X	242
Conclusões.....	244
Agradecimentos	244
Referências Bibliográficas	244

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Fig. 1.** Estrutura do glicerol. 24
- Fig. 2.** Estrutura básica dos fosfolipídios da lecitina de soja. R_1 e R_2 representam os níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados (Schneider, 1997; Erickson, 1998). 30
- Fig. 3.** Estrutura das saponinas (A) esteroidal e (B) triterpênica. 32
- Fig. 4.** Estrutura das saponinas (A) esteroidal momodesmosídica e (B) triterpênica bidesmosídica. 33
- Fig. 5.** Representação esquemática de um extrusor monorosca. L = distância ao longo do eixo do extrusor (Vignol, 2005). 46
- Fig. 6.** Representação esquemática de uma extrusão a sopro (Lim et al., 2008). 49

CAPÍTULO 3

- Fig. 1.** Effect of the plasticizer (C_P) and lecithin (C_L) concentrations on tensile strength: (I) $C_L = 10$ g/100 g of plasticizer; (II) $C_L = 30$ g/100 g of plasticizer and (III) $C_L = 60$ g/100g of plasticizer. Note: different letters inside the figure indicate significant difference between the averages ($p < 0.05$), capital letters represent acetyltributyl citrate (ATB) and lower case letters represent tributyl citrate (TB). 90
- Fig. 2.** Micrographs by SEM of surface (left column) and internal structure (right column) of gelatin films: (a) and (b) film containing 10 g of ATB/100 g gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of ATB; (c) and (d) film containing 75g of ATB/100g gelatin plus 30 g of lecithin/100 g of ATB; (e) and (f) film containing 10 g of TB/100 g gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of TB; (g) and (h) film containing 75 g of TB/100 g gelatin plus 30 g of lecithin/100 g of TB (bars = $3\mu\text{m}$). 97
- Fig. 3.** Micrographs using merge mode, obtained by CLSM of gelatin films (gelatin + FITC and plasticizers and lecithin + Nile Red): (a) film containing 10 g of ATB/100 g gelatin without lecithin; (b) film containing 10 g of ATB/100 g protein plus 60 g of lecithin/100 g of ATB; (c) film containing 10 g of TB/100 g gelatin without lecithin, and (d) film containing 10 g of TB/100 g gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of TB (bars = $100\mu\text{m}$). 99

Fig. 4. FT-IR spectrum of gelatin films containing: (a) ATB and (b) TB. (1) Simple gelatin film, (2) 10g of plasticizer/100 g of gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of plasticizer and (3) 75 g of plasticizer/100 g of gelatin plus 30 g of lecithin/100 g of plasticizer.

CAPÍTULO 4

Fig. 1. Effect of the plasticizers concentrations (C_p) and yucca concentrations on tensile strength (TS) of based gelatin films.

Fig. 2. Effect of the plasticizers concentrations (C_p) on water vapor permeability (WVP) and solubility in films-based gelatin for 60 g of yucca 100 g⁻¹ of plasticizer. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

Fig. 3. Micrographs using merge mode, obtained by CLSM of gelatin films without (left column) and with (right column) yucca (gelatin + FITC and plasticizers and yucca + Nile Red). Concentration of plasticizer: 50 g 100 g⁻¹ of gelatin and concentration of yucca: 60 g 100 g⁻¹ of plasticizer, (bars = 10 μ m).

Fig. 4. Micrographs by SEM (bars = 3 μ m) of surface (left column) and internal structure (right column) of gelatin films with hydrophobic plasticizers and yucca. Concentration of plasticizer: 50 g 100 g⁻¹ of gelatin and concentration of yucca: 60 g 100 g⁻¹ of plasticizer.

Fig. 5. FTIR spectrum of gelatin films containing hydrophobic plasticizers and yuca. Condition of lowest WVP for ATB, TB and ATC: 50 g of plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin plus 60 g of yucca 100 g⁻¹ of plasticizer.

CAPÍTULO 5

Fig. 1. Effect of surfactants concentration (C_s , lecithin or yucca) on mechanical properties of the gelatin-based films. (A) Tensile Strength (TS) and (B) Elongation. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

Fig. 2. Effect of surfactants concentration (C_s , lecithin or yucca) on moisture content of gelatin-based films. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

Fig. 3. Effect of surfactants concentration (C_S , lecithin or yucca) on water vapor permeability (WVP) of the gelatin-based films. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

Fig. 4. Effect of surfactants concentration (C_S , lecithin or yucca) on solubility of the gelatin-based films. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

Fig. 5. SEM micrographs (bars = 3 μm) of surface (left column) and internal structure (right column) of gelatin-based films containing natural surfactants soy lecithin or yucca. (A) and (B) 16% lecithin (w/w), (C) and (D) 120% lecithin (w/w), (E) and (F) 16% yucca (w/w), (G) and (H) 120% yucca (w/w).

Fig. 6. FT-IR spectrum of gelatin-based films containing soy lecithin (A) and yucca (B). (1) 120 g of surfactant 100 g^{-1} of protein; (2) 16 g of surfactant 100 g^{-1} of protein; (3) pure soy lecithin or yucca and (4) simple gelatin-based film.

Fig. 7. X-ray diffraction of gelatin-based films as a function of (A) lecithin and (B) yucca concentration.

CAPÍTULO 6

Fig. 1. Superfície de resposta para alongamento (%A): efeito das concentrações do glicerol (C_G) e extrato de yucca (C_Y).

Fig. 2. Micrografias obtidas por MEV da seção interna de filmes a base de gelatina contendo extrato de yucca produzidos por extrusão (coluna esquerda, barra = 30 μm) e por *casting* (coluna direita, barra = 3 μm). (A) e (B) 48% extrato de yucca mais 8,75% glicerol, (C) e (D) 48% extrato de yucca mais 0,25% glicerol.

Fig. 3. Espectros de infravermelho de filmes a base de gelatina produzidos pelos métodos da extrusão (A e C) e por *casting* (B e D), contendo (A) e (B) 48% extrato de yucca mais 8,75% glicerol, (C) e (D) 48% extrato de yucca mais 0,25% glicerol.

Fig. 4. Difractogramas de raios-X para filmes a base de gelatina produzidos pelos métodos da extrusão e por *casting*, contendo (A) 48% extrato de yucca mais 0,25% glicerol e (B) 48% extrato de yucca mais 8,75% glicerol.

ANEXO IV

Fig. A1.IV. Curva de sorção de umidade para filmes extrusados a base de gelatina contendo lecitina. 228

Fig. A2.IV. Morfologia da seção interna de filmes a base de gelatina contendo lecitina, produzidos pelos métodos de extrusão (coluna da esquerda, barra = 30 μm) e por *casting* (coluna da direita, barra = 3 μm). (A) e (B) 48% lecitina e 1% glicerol; (C) e (D) 23,86% lecitina e 3% glicerol. 229

Fig. A3.IV. Espectros de infravermelho de filmes extrusados e feitos por *casting* a base de gelatina contendo lecitina. (A) 48% lecitina e 1% glicerol, (B) 23,86% lecitina e 3% glicerol. 231

Fig. A4.IV. Difratoograma de raios-X para filmes a base de gelatina contendo lecitina processados por extrusão e feitos por *casting*. (A) 48% lecitina e 1% glicerol, (B) 23,86% lecitina e 3% glicerol. 232

ANEXO V

Fig. A1.V. Formação de filmes tubulares a base de gelatina e extrato de yucca pela técnica de sopro. 237

Fig. A2.V. Início da formação do filme soprado à esquerda e momento em que os rolos puxadores agem sobre o filme à direita. 237

Fig. A3.V. Curva de sorção de umidade para filmes a base de gelatina e extrato de yucca processados por extrusão e extrusão-sopro. 240

Fig. A4.V. Morfologias da superfície (imagem superior, barra = 3 μm) e seção transversal (imagem inferior, barra = 10 μm) de filmes soprados a base de gelatina e extrato de yucca. 241

Fig. A5.V. Espectros de infravermelho para filmes a base de gelatina contendo extrato de yucca e glicerol produzidos por extrusão (1) e por extrusão-sopro (2). 242

Fig. A6.V. Difratoogramas de raios-X para filmes a base de gelatina e extrato de yucca obtidos pelos métodos de extrusão e extrusão-sopro. 243

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição de aminoácidos das gelatinas tipo A e tipo B.	18
Tabela 2. Características dos plastificantes derivados do citrato.	26
Tabela 3. Composição aproximada de lecitina de soja natural comercial.	29
Tabela 4. Valores de HLB para produtos fosfolipídios comerciais.	31
Tabela 5. Propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água de filmes biodegradáveis e convencionais.	54
Tabela 6. Propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água e solubilidade de filmes protéicos processados por extrusão ou moldagem por compressão.	61

CAPÍTULO 3

Table 1. Effect of concentration of plasticizer (C_p) and of the concentration of soy lecithin (C_L) in the variables: elongation (E), elastic modulus (EM), water vapor permeability (WVP) and opacity (O_p) of gelatin-based films plasticized with tributyl citrate (TB) and with acetyltributyl citrate (ATB).	92
---	----

CAPÍTULO 4

Table 1. The mean diameters of emulsion droplets (d_m) obtained from filmogenic solutions containing gelatin and hydrophobic plasticizers (ATB, TB and ATC) with and without the presence of yucca (C_Y).	130
--	-----

CAPÍTULO 5

Table 1. Opacity (%) and b^* (croma b^*) of gelatin-based films containing natural surfactants (soy lecithin or yucca).	158
---	-----

CAPÍTULO 6

Tabela 1. Matriz do delineamento experimental para os filmes a base de gelatina extrusados com extrato de yucca com as variáveis reais e codificadas e as respostas do processo.	182
---	-----

Tabela 2. Análise de variância para o ajuste de modelos linear e quadrático aos valores de tensão na ruptura (TR), alongamento (%A) e teor de umidade (Um).	183
Tabela 3. Comparação entre as propriedades mecânicas, solubilidade e umidade de filmes a base de gelatina e extrato de yucca (concentração de 48 g 100 g ⁻¹ de proteína), produzidos por extrusão e por <i>casting</i> .	187
Tabela 4. Temperatura de transição vítrea (Tg) de filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão e por <i>casting</i> .	191
Tabela 5. Índice de cristalinidade relativa de filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão e por <i>casting</i> .	194

ANEXO II

Tabela A.II. Características físico-químicas de plastificantes hidrofóbicos (Vertellus, 2010).	220
---	-----

ANEXO III

Tabela A1.III. Valores de umidade, insolúveis em acetona e ácidos graxos da lecitina de soja comercial.	221
Tabela A2.III. Propriedades físico-químicas do extrato de <i>Yucca schidigera</i> .	221

ANEXO IV

Tabela A1.IV. Matriz do delineamento experimental para os filmes extrusados com lecitina com as variáveis reais e codificadas e as respostas do processo.	224
Tabela A2.IV. Adequação das condições de processamento no extrusor para as amostras contendo lecitina (taxa de alimentação: 16 rpm).	225
Tabela A3.IV. Comparativo entre as propriedades mecânicas e solubilidade para os filmes a base de gelatina, lecitina e glicerol, produzidos por <i>casting</i> e extrusão.	227
Tabela A4.IV. Temperatura de transição vítrea (Tg) para filmes extrusados e feitos por <i>casting</i> a base de gelatina contendo lecitina.	230

ANEXO V

Tabela A1.V. Comparação entre a solubilidade (Sol) e teor de umidade (Umi) para 239
filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão,
extrusão-sopro e por *casting*.

Tabela A2.V. Índice de cristalinidade relativa obtido para os filmes a base de 243
gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão, extrusão-sopro e por
casting.

RESUMO GERAL

Um problema limitante no uso de filmes biodegradáveis a base de macromoléculas naturais é a sua susceptibilidade à umidade ambiente, pois as macromoléculas e os plastificantes normalmente utilizados apresentam caráter hidrofílico. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes a base de gelatina adicionando-se compostos com características hidrofóbicas e a caracterização de suas propriedades funcionais. O desenvolvimento dos filmes foi estudado em quatro etapas: (1) e (2) produção via *casting* de filmes emulsionados, plastificantes hidrofóbicos (citrato de tributila - TB, citrato de acetiltributila - ATB, citrato de trietila - TC, citrato de acetiltrieta - ATC) e surfactantes naturais, lecitina de soja e extrato de *Yucca Schidigera* (yucca), respectivamente, nas primeira e segunda etapas; (3) produção via *casting* de filmes emulsionados, somente com a adição dos surfactantes (lecitina e extrato de yucca); e por fim (4) produção pela técnica da extrusão de filmes de gelatina adicionados do surfactante extrato de yucca. Nas etapas descritas os filmes resultantes foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água (PVA), ópticas, microestruturais e de solubilidade. Como análises complementares foram realizadas análises para determinação da temperatura de transição vítrea (T_g), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e difração de raios-X. Nas primeira e segunda etapas, independente do surfactante e do tipo de plastificante utilizado, ocorreu decréscimo dos valores de tensão na ruptura (TR) com o aumento na concentração dos plastificantes, variando de 103 a 36 MPa, quando a lecitina foi usada, e de 95 a 50 MPa quando o extrato de yucca foi utilizado. Porém nessas duas etapas não foi observada relação entre os plastificantes e as quantidades utilizadas sobre o alongamento (%A), apresentando pouca variação e valores baixos, variando de 3 a 13% para a primeira e segunda etapas. Os valores de permeabilidade ao vapor de água foram reduzidos a $0,17 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ na etapa com o uso da lecitina (primeira etapa) e $0,06 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ para a etapa onde o extrato de yucca foi utilizado (segunda etapa). Na terceira etapa do trabalho, filmes com extrato de yucca apresentaram maiores valores de TR (90-40 MPa), menor alongamento (média de 5%) e PVA inferior, com valores de $0,22$ a $0,09 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ quando comparados aos filmes com lecitina. A adição de quantidades crescentes dos surfactantes (lecitina ou yucca) resultou em decréscimo significativo da TR e PVA, e o uso da yucca resultou em filmes significativamente mais

solúveis (20-50%) que filmes adicionados de lecitina (<10%). Na quarta etapa, o processamento por extrusão da gelatina e extrato de yucca produziu filmes com elevados valores de %A e reduzidas TR em relação aos filmes obtidos por *casting*, respectivamente, com valores de 40 a 156% e 19 a 34 MPa. Formulações correspondentes a maior e o menor alongamento, obtidas nessa etapa, foram utilizadas para produção de filmes por *casting*. A solubilidade dos filmes produzidos por extrusão e por *casting* não apresentou diferença significativa com valores variando de 37 a 40%. Em todas as etapas, a análise de FTIR não mostrou evidências de interações adicionais entre os compostos adicionados (plastificantes e surfactantes) e a gelatina. Os resultados obtidos indicam que os filmes produzidos nas três primeiras etapas do trabalho não melhoraram sua flexibilidade, porém a inclusão de substâncias com características hidrofóbicas promoveu a redução da PVA de forma significativa. O processamento termoplástico de filmes a base de gelatina produziu aumento no alongamento, entretanto avaliações mais específicas da adição de compostos parcialmente hidrofóbicos como os surfactantes e a otimização das condições de extrusão, são estudos necessários.

Palavras chaves: filmes biodegradáveis, gelatina, plastificante hidrofóbico, ésteres de citrato, lecitina de soja, *Yucca schidigera*, casting, extrusão.

GENERAL ABSTRACT

One problem limiting the use of biodegradable films based on natural macromolecules is its susceptibility to humidity, because the macromolecules and the plasticizers typically used have hydrophilic character. The aim of this work was the development of gelatin-based films by adding compounds with hydrophobic characteristics and characterization of functional properties. The development of the films was studied into four stages: (1) and (2) production by emulsion casting film, using hydrophobic plasticizers (tributyl citrate - TB, acetyltributyl citrate - ATB, triethyl citrate - TC and acetyltriethyl citrate - ATC) and natural surfactants, soy lecithin and extract of *Yucca Schidigera* (yucca), respectively, for the first and second stages; (3) production by emulsion casting film only with the addition of surfactants (lecithin and yucca extract), (4) production by extrusion method of gelatin-based films containing yucca extract. In the stages described the films were characterized by mechanical, barrier to water vapor (WVP), solubility, optical and microstructural properties. Additional tests were performed as glass transition temperature, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and X-ray diffraction. In the first and second stages, regardless of the type and concentration of surfactant and plasticizer used, was observed a decreasing in tensile strength values (TS) with increasing plasticizers concentrations, varying from 103 to 36 MPa, when the lecithin was used, and between 95 to 50 MPa when the yucca extract was used. In these two steps was not observed relationship between the plasticizers and the quantities used on the elongation (%E), showing little variation and low values, ranging from 3 to 13% for the first and second steps. The WVP values were reduced to $0.17 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ in the step with the use of lecithin (first stage) and $0.06 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ for the step where the yucca extract was used (second stage). In the third stage of this work, films made with yucca extract had higher values of TR (90-40 MPa), lower elongation (~5%) and WVP lower, with values ranging from 0.22 to $0.09 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ when compared to films made with lecithin. The addition of increasing amounts of surfactants (lecithin or yucca) showed a significant decrease in TS and WVP, and the use of yucca extract resulted in films significantly more soluble (20-50%) than lecithin-containing films (<10%). In fourth stage, the thermoplastic processing of gelatin and yucca extract produced films with high values of %E and reduced TS compared to films obtained by casting method, respectively, with values from 40 to 156% and 19-

34 MPa. Formulations corresponding to the highest and lowest elongation, obtained in this stage, were used for production films by casting method. The solubility of the films produced by extrusion and casting did not show significant differences with values ranging from 37 to 40%. At all stages, the FTIR analysis showed no evidence of additional interactions between the added compounds (plasticizers and surfactants) and gelatin. The results indicate that the gelatin-based films, produced by casting, added plasticizers and natural surfactants may not have improved their flexibility, but the inclusion of hydrophobic substances promoted the reduction of WVP significantly. The thermoplastic processing of gelatin-based films by adding yucca extract produced an increase in elongation, however more specific evaluations of the addition of partially hydrophobic compounds such as surfactants and optimization of extrusion conditions are necessary.

Keywords: biodegradable films, gelatin, hydrophobic plasticizer, citrate esters, soy lecithin, *Yucca schidigera*, casting, extrusion.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

OBJETIVOS GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Os plásticos são materiais que possuem alta durabilidade, são funcionalmente adequados para muitas utilizações cotidianas e atendem às exigências do mercado, pois além de suas propriedades físicas e mecânicas, possuem alta versatilidade de uso e preço. No entanto, estima-se que mais de 100 milhões de toneladas de plásticos sejam produzidos por ano acarretando grande quantidade de resíduos descartados na natureza (Huang e Edelman, 1995). Esse descarte contribui com uma parte considerável dos resíduos globais nos aterros sanitários municipais e representam um sério problema ambiental, uma vez que os plásticos sintéticos são polímeros resistentes à degradação natural (Chiellini et al., 2001) e, devido a sua alta massa molar e hidrofobicidade dificultam a ação dos microrganismos e de enzimas na superfície do polímero (Lee e Cho, 1998; Rosa et al., 2004).

Visando atenuar esses problemas algumas técnicas foram desenvolvidas para o tratamento do resíduo plástico, como por exemplo, incineração, o uso de aterros sanitários, reciclagem, desenvolvimento de blendas de plásticos sintéticos e materiais biodegradáveis (Franchetti e Marconato, 2006). O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis, caracterizados por se degradarem em gás carbônico, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas, também é outra forma de enfrentar esse problema (Rosa et al., 2004). A área de produção e caracterização de filmes à base de macromoléculas naturais como alternativa para o uso de embalagens sintéticas, tem ocupado lugar de destaque no meio científico, onde desde 1990 mais de 90 patentes envolveram o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis e/ou comestíveis (Debeaufort et al., 1998). Os biomateriais utilizados não são poluentes, pois consistem de

substâncias naturais e biodegradáveis. Entretanto, esse tipo de material, dependendo da sua constituição, não possui a capacidade de substituir por completo as embalagens sintéticas com o objetivo de proteger e prolongar a vida de prateleira dos alimentos, mas, a utilização de filmes e coberturas biodegradáveis está relacionada com a capacidade de agir como um complemento na promoção da qualidade e aumento do tempo de estocagem de alimentos (Kester e Fennema, 1986). Esses filmes podem ser usados como envoltórios para alimentos, separadores entre componentes alimentícios, ou selados a altas temperaturas para a formação de sacos, sachês e bolsas de contenção de alimentos (Hernández-Izquierdo e Krochta, 2008). Os filmes também podem atuar como barreira a transferência de massa, como vapor de água, gases e óleo; podem atuar como transportador de ingredientes alimentícios e aditivos, como antioxidantes, agentes antimicrobianos e pigmentos; e ainda funcionar como uma proteção mecânica contra a deterioração do produto envolvido (Debeaufort et al., 1998; Donhowe e Fennema, 1994).

Dentre os biopolímeros naturais utilizados na elaboração de filmes e coberturas biodegradáveis estão a celulose, amido, goma, quitina entre outros; e as proteínas como colágeno, gelatina, caseína, glúten entre outras (Kester e Fennema, 1986). As proteínas têm sido motivo de muitos estudos, devido às suas propriedades funcionais e também à grande variedade de fonte e baixo custo de produção (Vanin et al., 2005). De maneira geral, esses filmes apresentam, quando associados a plastificantes hidrofílicos, alta elasticidade, razoável resistência mecânica, alta permeabilidade ao vapor de água e elevada sensibilidade às condições ambientais, notadamente à umidade relativa, devido ao caráter higroscópico dos constituintes filmogênicos.

Com o intuito de reduzir essa susceptibilidade, alternativas como modificações químicas ou enzimática das macromoléculas, ou ainda a adição de lipídios na formulação

dos filmes, têm sido estudadas (Ghorpade et al., 1995; Galletta et al., 1998; Carvalho e Grosso, 2004; Bertan et al., 2005; Chen et al., 2009). Entretanto, as modificações químicas ou enzimáticas não alteram significativamente a susceptibilidade do material às condições do ambiente, enquanto a adição de lipídios, apesar de melhorar a permeabilidade ao vapor de água, pode comprometer as propriedades mecânicas do material (Kester e Fennema, 1986). Os filmes feitos com a combinação de proteínas e lipídios podem ser na forma laminada, como filmes bicamadas (Debeaufort et al., 2000; Kristo et al., 2007; Chen et al., 2010) ou na forma de emulsão (Pommet et al., 2003; Fabra et al., 2008; Wang et al., 2009; Chen et al., 2009). Outra opção para se melhorar a propriedade de barreira ao vapor de água é a adição de surfactantes na solução filmogênica (Villalobos et al., 2006; Rodrigues et al. 2006; Bravin et al., 2004). Surfactantes como substâncias anfífilas, possuem em sua molécula simultaneamente partes hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais podem interagir com partes semelhantes presentes na proteína, onde a macromolécula pode ser estabilizada por ligações de hidrogênio e também por interações apolares (Lillie e Gosline, 1993).

Os métodos de produção de filmes são divididos em “processos úmidos” ou *casting* e “processos secos” que utilizam o comportamento termoplástico apresentado por algumas proteínas e polissacarídeos em baixos níveis de umidade, incluindo as técnicas de extrusão, moldagem por compressão, injeção e sopro (Liu et al., 2006; Verbeek e van den Berg, 2010). O processamento termoplástico de proteínas, aplicado na produção contínua de filmes e coberturas em larga escala é promissor devido à possibilidade de modificação estrutural dos polímeros utilizados, possibilitando melhora na funcionalidade dos filmes (Hernández-Izquierdo e Krochta, 2008). Durante a extrusão, quantidade considerável de energia mecânica é fornecida ao material a ser processado, e esse tratamento severo pelo qual o material passa, afeta as suas propriedades finais. Considerando ainda que as

proteínas possuem diferentes grupos funcionais, há inúmeras possibilidades de interações e arranjos que podem ser formados, dependendo das condições de processamento e do tipo de proteína utilizada (Verbeek e van den Berg, 2010). Por outro lado, a possibilidade de aumento nas interações intermoleculares, pode causar a redução da mobilidade molecular e aumento da viscosidade do material, o que pode dificultar o processamento, sendo necessário, dessa forma, a utilização de temperaturas geralmente altas e superiores à temperatura de degradação da proteína. Para impedir essa degradação, aditivos são requeridos para alterar o ponto de fusão da proteína e tornar viável a extrusão termoplástica protéica (Verbeek e van den Berg, 2010).

1.1. Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento de filmes biodegradáveis a base de gelatina adicionados de plastificantes hidrofóbicos e surfactantes naturais e sua caracterização funcional.

Objetivos específicos

- Desenvolvimento da metodologia para produção por via úmida (*casting*) de filmes emulsionados a base de gelatina utilizando-se os seguintes plastificantes hidrofóbicos: citrato de tributila, citrato de acetiltributila, citrato de trietila, citrato de acetiltrieta e como agentes surfactantes lecitina de soja e extrato de *Yucca schidigera*;
- Estudar o efeito do tipo e concentração dos plastificantes e dos agentes surfactantes nas propriedades funcionais do filmes (propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água, solubilidade, opacidade);

- Determinar a miscibilidade / compatibilidade da gelatina com os plastificantes hidrofóbicos e surfactantes através da análise da transição vítrea (Tg), espectroscopia de infravermelho;
- Determinar as propriedades morfológicas dos filmes através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de varredura a laser confocal;
- Desenvolvimento e caracterização, por extrusão, de filmes a base de gelatina e surfactante extrato de *Yucca Schidigera*;
- Comparar as propriedades físico-químicas dos filmes obtidos por extrusão e filmes correlatos feitos por *casting*.

1.2. Estrutura da tese

O trabalho foi dividido em capítulos que estão descritos a seguir:

Capítulo 1: “**Introdução**”, onde consta a justificativa do trabalho e objetivos dessa tese.

Capítulo 2: “**Revisão Bibliográfica**” são apresentados fundamentos teóricos sobre materiais biodegradáveis, filmes e coberturas biodegradáveis e/ou comestíveis, métodos de processamento de filmes, matérias-primas utilizadas na elaboração de filmes biodegradáveis e suas propriedades funcionais.

Capítulo 3: “**Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films**”, nesse capítulo apresenta-se o desenvolvimento e caracterização de

filmes biodegradáveis a base de gelatina produzidos pela técnica de *casting*, com utilização de plastificantes hidrofóbicos e surfactante lecitina de soja, bem como o efeito desses aditivos nas propriedades funcionais dos filmes produzidos.

Capítulo 4: **“Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant”**, nessa seção são apresentados o desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de gelatina produzidos pela técnica de *casting*, com utilização de plastificantes hidrofóbicos e surfactante extrato de *Yucca schidigera*, bem como o efeito desses aditivos nas propriedades funcionais dos filmes produzidos.

Capítulo 5: **“Effect of surfactants on the functional properties of gelatin edible films”**. Nesse capítulo é apresentado o efeito de surfactantes naturais lecitina de soja e extrato de *Yucca schidigera* na produção de filmes biodegradáveis a base de gelatina, na ausência dos plastificantes hidrofóbicos.

Capítulo 6: **“Propriedades funcionais de filmes a base de gelatina contendo extrato de *Yucca schidigera* produzidos por extrusão e *casting*”** Nesse capítulo são apresentados o desenvolvimento e caracterização de filmes a base de gelatina e extrato de yucca obtidos pelo processo de extrusão, bem como uma comparação com filmes correlatos elaborados pela técnica de *casting*.

Capítulo 7: **“Conclusão geral”**, nesse capítulo são apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

1.3. Referências Bibliográficas

- Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19, 73-82.
- Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2004). Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6448-6455.
- Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2004). Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18, 717-726.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.S. (2010). Water barrier and physical properties of starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films: impact of surfactant lamination. *Food Hydrocolloids*, 24, 200-207.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.-S. (2009). Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in. *Food Hydrocolloids*, 23, 714-721.
- Chiellini, E., Cinelli, P., Corti, A. & Kenawy, E. R. (2001). Composite films based on waste gelatin: thermal-mechanical properties and biodegradable testing. *Polymer Degradation and Stability*, 73, 549-555.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Delport, B., & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180, 47-55.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings:

tomorrow's packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 299-313.

Donhowe, I. G., & Fennema, O. (1994). Edible films and coating: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, M. O. (Ed.). *Edible coatings and films to improve food quality*, pp. 1-24. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc.

Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.

Franchetti, S. M. M., & Marconato, J. C. (2006). Polímeros biodegradáveis: uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, 29, 811-816.

Galietta, G., di Gioia, L., Guilbert, S., & Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, 81, 3123-3130.

Ghorpade, V. M., Gennadios, A., & Hanna, M. A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Transactions of the American Society of the Chemical Engineers*, 38, 1805-1808.

Hernández-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation – a review. *Journal of Food Science*, 73, R30-R39.

Huang, S. J., & Edelman, P. G. (1995). *Degradable polymers: principles and applications*. In: Scott, G., & Gilead, D. (Eds.). London: Chapman & Hall.

Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, 40, 47-59.

Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Zampraka, A. (2007). Water vapor barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101, 753-764.

- Lee, K. H. & Cho, C. G. (1998). Preparation of starch-g-PMMA copolymer by emulsion polymerization. *Polymer*, 22, 570-578.
- Lillie, M. A., & Gosline, J. M. (1993). The effect of swelling solvents on the glass transition in elastin and other proteins. In: Blanshard, J. M., & Lillford, P. J. (Eds.). *The glassy state in foods*, pp. 281-301, Nottingham, U.K: Nottingham University Press.
- Liu, L., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2006). Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 295-302.
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., & Guilbert, S. (2003). Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44, 115-122.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39, 840-846.
- Rosa, D. S., Lotto, N. T., Lopes, D. R., & Guedes, C. G. F. (2004). The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate) and poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate). *Polymer Testing*, 23, 3-8.
- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). Effect of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin based films. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-907.
- Verbeek, C. J. R., & van den Berg, L. E. (2010). Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 10-21.
- Villalobos, R., Hernández, P., & Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxupropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-209.

Wang, L., Auty, M. A. E., Rau, A., Kerry, J. F, & Kerry, J. P. (2009). Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of Food Engineering*, 90, 11-19.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Filmes biodegradáveis: definição, métodos de produção, características e funcionalidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Materiais biodegradáveis

Visando atenuar problemas de excessivo descarte de materiais plásticos no ambiente, inúmeros estudos têm sido realizados na busca e no desenvolvimento de materiais plásticos biodegradáveis. O conceito de plástico biodegradável está associado ao uso de matérias-primas renováveis, os também chamados biopolímeros, que são macromoléculas sintetizadas sejam por processos biológicos ou por via química a partir de monômeros naturais ou idênticos aos naturais (Guilbert, 1986).

A degradação é um processo irreversível que leva a uma alteração significativa na estrutura do material, tipicamente caracterizada pela perda de propriedades (por exemplo, perda da integridade, massa molar e força mecânica) e/ou fragmentação. A degradação é afetada pelas condições ambientais que perdura por um determinado período e pode envolver uma ou mais etapas. O material é denominado degradável com respeito às condições específicas do ambiente quando sofre degradação de acordo com métodos particulares de teste padrão dentro de um determinado tempo. A biodegradação é a degradação causada pela atividade biológica, especialmente pela ação enzimática, permitindo alterações profundas na estrutura química do material (Pagga, 1998).

2.2. Filmes e coberturas biodegradáveis e/ou comestíveis

Os biofilmes podem ser de dois tipos: coberturas, quando são aplicadas ou produzidas diretamente sobre as superfícies dos alimentos, ou filmes, que são estruturas independentes formadas sobre um determinado suporte e podem ser aplicadas sobre os alimentos após o seu preparo. Ambos são definidos como uma fina camada contínua formada ou depositada no alimento, preparada a partir de materiais biológicos, que pode agir como barreira a elementos externos (umidade, óleos, gases), protegendo o alimento e podendo aumentar sua vida de prateleira. Podem funcionar como materiais seletivos quanto à transferência de massa, e em alguns casos possuem propriedades ativas ou podem ainda conter as duas características. Propriedades ativas dos filmes e coberturas incluem: inibir migração de umidade, retardar o transporte de solutos, oferecer integridade estrutural adicional aos alimentos, reter compostos aromáticos e poder carregar aditivos alimentícios (Debeaufort et al., 1998; Krochta e Mulder-Jonhston, 1997).

2.3. Matérias-primas usadas em filmes biodegradáveis

2.3.1. Proteínas

Proteínas são consideradas heteropolímeros, onde 20 tipos de aminoácidos formam as unidades monômeras e é quase ilimitado o número de arranjos sequenciais desses aminoácidos, o que possibilita uma grande quantidade de interações e reações químicas. As unidades de aminoácidos que contêm átomos de carbono e nitrogênio, irão se diferenciar pela presença dos grupos funcionais (Stevens, 1999; Pommet et al., 2003a). A proteína, de

acordo com Verbeek e van den Berg (2010), no seu estado natural, possui uma forma “torcida”, que caracteriza uma estrutura macromolecular tridimensional, e contém uma estrutura secundária, terciária e quaternária as quais são estabilizadas através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações dissulfídicas entre os aminoácidos dos grupos funcionais. Uma vez “torcida” a estrutura pode ser adicionalmente estabilizada por ligações covalentes. As proteínas também são fontes renováveis, biodegradáveis e comestíveis com potencial de utilização no melhoramento da qualidade e estabilidade de muitos produtos alimentícios, por meio de inúmeras técnicas de processamento (Hernández-Izquierdo e Krochta, 2008).

Filmes a base de proteínas consistem em redes macromoleculares contínuas, de baixa umidade, e mais ou menos ordenadas. A probabilidade de formação de ligações inter e intramoleculares cruzadas entre as cadeias do polímero depende da estrutura da proteína, do processo de elaboração, parâmetros físicos (temperatura, pressão, solvente entre outros) e presença de aditivos, tais como plastificante e agente reticulador (Gontard e Guilbert, 1994). Segundo Cuq et al. (1998) uma rede macromolecular protéica é formada a partir da ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia as quais estabilizam os polímeros no seu estado nativo e depende também do reordenamento e orientação das cadeias poliméricas e ainda da formação de uma estrutura tridimensional estabilizada por novas interações realizadas após ou durante a evaporação do solvente. A capacidade da proteína de formar ou não estruturas filmogênicas está relacionada com a sua capacidade de formar as ligações cruzadas entre suas próprias moléculas (Cuq et al., 1996).

As propriedades funcionais, sensoriais, nutricionais dos filmes protéicos dependem do potencial de formação dessa rede coesa e das ligações cruzadas intra e intermoleculares. As interações proteína-água, que estão relacionadas à solubilidade, capacidade de

hidratação e de retenção de água, é de importância na preparação da solução filmogênica, pois uma baixa solubilidade da proteína no solvente utilizado implica em soluções não uniformes e filmes heterogêneos (Cuq et al., 1996).

Geralmente os filmes protéicos apresentam boas propriedades mecânicas, sendo ideal seu uso para produtos que precisam manter a sua integridade como, por exemplo, embalar ou recobrir produtos mais frágeis. Devido ao caráter polar da proteína, filmes protéicos também apresentam alta barreira ao oxigênio, mas reduzida barreira ao vapor de água (Krochta et al., 1994). Para sanar essa deficiência, a inclusão de materiais hidrofóbicos, como por exemplo, lipídios, é realizada de forma a proporcionar ao material maior barreira ao vapor de água. No entanto, filmes feitos somente a base de lipídios normalmente não produzem materiais com boa integridade estrutural e durabilidade, apresentam aspecto quebradiço sendo dificultado o seu manuseio. Por isso, costuma-se utilizar combinações de materiais hidrofílicos com hidrofóbicos, de forma a compensar as desvantagens de um com as vantagens do outro (Krochta et al., 1994; Liu et al., 2006).

Alguns exemplos de proteínas utilizadas, atualmente, em estudos de embalagens biodegradáveis e/ou comestíveis são gelatina (Vanin et al., 2005; Thomazine et al., 2005; Carvalho e Grosso, 2004), glúten de trigo (Gontard et al., 1993; Pommet et al., 2003a; Domenek et al., 2004), proteínas do músculo de peixe (Sobral et al., 2005; Garcia e Sobral, 2005; Paschoalick et al., 2003), proteínas miofibrilares de peixe (Cuq et al., 1997a e b; Monterrey-Quintero e Sobral, 1999, 2000; Sobral et al., 2002), blendas de isolado protéico de soro de leite e caseinato de sódio (Longares et al., 2005), isolado protéico de soro de leite (Yoshida e Antunes, 2004; Coupland et al., 2000), proteínas do amendoim (Jangchud e Chinnan, 1999), proteínas solúveis do músculo de peixe (Iwata et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Bourtoom et al., 2005), isolado protéico de semente de girassol (Orliac et al., 2003),

dentre outras.

2.3.1.1. Gelatina

A gelatina caracteriza-se por ser um hidrocolóide, portanto com natureza hidrofílica, e é derivada da desnaturação do colágeno, uma abundante proteína presente nos tecidos conectivos de animais vertebrados (cerca de 50% do total da proteína humana) e invertebrados (Arvanitoyannis, 2002). A dissociação térmica ou química das cadeias polipeptídicas do colágeno dá origem à gelatina, onde o colágeno insolúvel é convertido em gelatina solúvel (em temperaturas acima de 50 °C) como resultado da hidrólise ácida ou básica. Sendo o colágeno produzido pelo processo ácido classifica-se a gelatina resultante em tipo A e, pelo processo básico, gelatina tipo B (Arvanitoyannis, 2002).

A gelatina é uma mistura de polipeptídios que podem ser diferentes, dependendo da origem da matéria-prima utilizada na sua produção (ossos, peles bovinas e suínas e de tecidos conectivos). Independente da fonte, a gelatina contém 18 aminoácidos (Tabela 1), sendo predominantes a glicina e a alanina que contabilizam aproximadamente de um terço a metade do total dos resíduos de aminoácidos. A glicina é predominante no resíduo terminal N da gelatina obtida pelo processo básico enquanto que a alanina tende a ser predominante na gelatina processada em meio ácido. A prolina e hidroxiprolina também são predominantes, contabilizando aproximadamente um quarto dos resíduos de aminoácidos, e estão presente tanto na gelatina tipo A ou tipo B (Djagny et al., 2001). A diferença de matéria-prima empregada também interfere na massa molar da gelatina, bem como o método de extração e condições de manuseio e pode variar de 10^5 a 10^6 Da (Arvanitoyannis, 2002). Ela é diferenciada das outras proteínas, pois não apresenta uma ordem interna, em soluções aquosas a altas temperaturas, as cadeias polipeptídicas

apresentam configuração aleatória (Veis, 1994).

Tabela 1. Composição de aminoácidos das gelatinas tipo A e tipo B.

<i>Aminoácido</i>	<i>Gelatina tipo A¹</i>	<i>Gelatina tipo B¹</i>
Glicina	33,0	33,5
Prolina	13,2	12,4
Alanina	11,2	11,7
Hidroxiprolina	9,1	9,3
Ácido glutâmico	7,3	7,2
Arginina	4,9	4,8
Ácido aspártico	4,5	4,6
Serina	3,5	3,3
Lisina	2,7	2,8
Valina	2,6	2,2
Leucina	2,4	2,4
Treonina	1,8	1,8
Fenilalanina	1,4	1,4
Isoleucina	1,0	1,1
Hidroxilisina	0,6	0,4
Histidina	0,4	0,4
Metionina	0,4	0,4
Tirosina	0,3	0,1

¹ Número de resíduos de aminoácidos em base a 100 resíduos totais. Fonte: Gennadios et al. (1994).

O valor comercial da gelatina aumenta com a capacidade de formação dos géis sob condições padronizadas, e a formação de géis está relacionada com as propriedades reológicas, tais como o *bloom* e a viscosidade (Krochta et al., 1994). Segundo esses mesmos autores o valor de *bloom* está relacionado com a força de gel e a viscosidade com a

massa molar média e em particular com o grau de polimerização da cadeia e, ambas as características estão relacionadas com a composição de aminoácidos. O valor de *bloom* a uma concentração de 6,67% normalmente serve para medir a força de gel, o aumento dos números de *bloom* corresponde a um aumento linear da força de gel. A força de gel também aumentará proporcionalmente à concentração da solução de gelatina e ao tempo de gelificação da mesma e diminuirá sob temperaturas mais baixas (Leuenberger, 1991). Podem ser encontradas no mercado gelatinas entre 50 e 300 *bloom* (Krochta et al., 1994). Comercialmente a gelatina também é avaliada pelo seu ponto isoelétrico (pI) e sua granulometria. O pI da gelatina pode variar em função da sua forma de obtenção e corresponde ao pH no qual as moléculas da proteína em solução é neutra, isto é, as cargas positivas são iguais às cargas negativas, portanto, nesse pH a proteína não migra para nenhum pólo quando colocada em um campo elétrico. O pI interfere no ponto de fusão, solubilidade, constantes dielétricas em solução aquosa e momento dipolar, propriedades essas que dependem da carga iônica (Cheftel et al., 1989). A gelatina do tipo A possui pI entre 7 e 9, enquanto que a do tipo B o pI se encontra entre os valores de 4,6 e 5,2 (Gennadios et al., 1994; Poppe, 1997).

A granulometria (tamanho das partículas) interfere na capacidade ou taxa de inchamento das partículas, que é influenciada pela temperatura e concentração de sais ou açúcares. A distribuição de tamanho das partículas pode ser selecionada para um processo em particular, sendo determinante na solubilização mais ou menos rápida e eficiente dessas partículas (Johnston-Banks, 1990).

A capacidade de inchamento da gelatina representa seu intumescimento quando colocada em água fria. Quando aquecida a temperaturas acima do ponto de fusão, a gelatina hidratada dissolve e forma gel quando esfriada. Esse processo de gelificação envolve a

renaturação parcial do colágeno, de estruturas no estado desordenado da gelatina, para estruturas tripla hélice (estrutura original do colágeno) e, o nível de gelificação dependerá da composição e estrutura da gelatina (Achet e He, 1995).

Outras características importantes da gelatina são a solubilidade em água e a capacidade de formação de gel termo-reversível, essa última garante a aplicação da gelatina em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e no ramo técnico como espessante, estabilizante, protetor coloidal, emulsificante, agente espumante, clarificante de bebidas entre outras aplicações (Djagny et al., 2001).

Há dois métodos pelo qual a gelatina pode ser solubilizada, sendo esses métodos direto ou indireto. No método direto, água quente (60 a 80 °C) é adicionada diretamente à gelatina sob forte agitação, o que pode causar formação de espuma, sendo esse um inconveniente na elaboração de filmes. No método indireto, inicialmente a gelatina é hidratada através da adição de água fria, a mesma é deixada em repouso de forma que todas as partículas estejam igualmente umedecidas e proporcione seu inchamento, a dissolução é completada sob aquecimento e agitação leve em temperaturas na faixa de 50 a 60 °C (Jonhston-Banks, 1990).

Mesmo sendo uma das primeiras matérias-primas empregadas no desenvolvimento de filmes biodegradáveis (Gennadios et al., 1994), a gelatina continua sendo amplamente utilizada em pesquisas desse tipo de material, pois constitui uma matéria-prima abundante, produzida em larga escala mundial por um baixo custo e possui excelentes propriedades formadoras de filmes (Vanin et al., 2005). As cadeias da gelatina formam uma rede tridimensional com zonas intermoleculares de microcristalinidade e a desidratação desse sistema pode produzir filmes quebradiços. Por isso, normalmente adicionam-se aditivos, como plastificantes, na elaboração de filmes a base de gelatina, com o intuito de reduzir as

interações intermoleculares e promover a flexibilidade do material formado (Sothornvit e Krochta, 2001).

2.3.2. Plastificantes

Os plastificantes são aditivos essenciais para a produção de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis. São substâncias com alto ponto de fusão, que quando adicionadas em outro material provocam certas mudanças nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos mesmos. Em termos estruturais, os plastificantes são inseridos na matriz, aumentando o espaço livre entre as cadeias poliméricas, provocando diminuição das forças intermoleculares ao longo da matriz, produzindo um decréscimo na força de coesão, força de tensão, transição vítrea e aumento na flexibilidade e manuseabilidade, com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças. A magnitude dessas mudanças estruturais no polímero pode ser usada como indicativo da eficiência de plastificação do material (Miller e Krochta, 1997; Sothornvit e Krochta, 2001; Krochta et al., 1994; Banker, 1966).

Algumas teorias sobre a ação do plastificante foram elaboradas, incluindo a teoria da lubrificação (“Lubricity theory”), a teoria do gel (“Gel theory”) e a teoria do volume livre (“Free volume theory”). A primeira indica que o plastificante atua como um lubrificante, provocando o deslizamento das cadeias poliméricas e facilitando a movimentação das macromoléculas umas sobre as outras. A segunda propõe que os plastificantes sobre as ligações dipolo-dipolo e forças de van der Waals atenuando-as e, conseqüentemente, diminuindo a rigidez do polímero. Por fim a terceira teoria prediz que o plastificante aumenta o volume livre, pois se interpõe entre as cadeias poliméricas e altera

as forças que mantêm as cadeias juntas, explicando a diminuição da temperatura de transição vítrea de acordo com o conteúdo de plastificante (Entwistle e Rowe, 1978). Entwistle e Rowe (1978) observaram que a eficiência do plastificante em reduzir a temperatura de transição vítrea aumenta com a diminuição do grau de interações plastificante-polímero. No geral as interações entre os polipeptídios e um plastificante não estão muito claras e podem ser sensíveis ao tamanho, massa molar e número de grupos hidroxilas presentes na molécula do plastificante (Guéguen et al., 1998).

A adição de plastificantes na produção de biopolímeros pode provocar um fenômeno de separação entre uma fração mais rica em plastificante e outra fração mais rica em macromolécula. Isso ocorre quando os plastificantes não são totalmente miscíveis com a macromolécula e essa separação de fase pode provocar perda de elasticidade (Sobral et al., 2001), ou ainda, as regiões ricas em plastificantes podem levar a formação de caminhos preferenciais, ou zonas de descontinuidades (Carvalho e Grosso, 2004), durante o processo de secagem (Menegalli et al., 1999), aumentando a difusão e conseqüentemente a permeabilidade ao vapor de água.

O plastificante e o polímero mantêm-se ligados devido à forças intermoleculares secundárias, formando um agregado molecular complexo. Dois tipos de plastificação podem ocorrer, a plastificação externa ou a interna. No caso da plastificação externa, usada na produção de filmes, o plastificante é adicionado ao polímero, ocorrendo apenas interações de natureza físico-químicas, reduzindo a coesão, enquanto que na plastificação interna, o plastificante altera a estrutura interna do polímero, como por exemplo, por copolimerização (Banker, 1966). Os plastificantes podem ser classificados em solúveis e insolúveis em água. De acordo com Siepmann et al. (1998), os solúveis serão denominados plastificantes hidrofílicos e os insolúveis plastificantes hidrofóbicos.

2.3.2.1. *Plastificantes hidrofílicos*

Dentre os plastificantes hidrofílicos mais utilizados atualmente estão o glicerol (Miller e Krochta, 1997; Coupland et al., 2000; Cho e Rhee, 2002; Carvalho e Grosso, 2004, Sobral et al., 2005; Vanin et al., 2005; Jongjareonrak et al., 2006), o sorbitol (Jangchud e Chinnan, 1999; Cho e Rhee, 2002; Thomazine et al., 2005; Jongjareonrak et al., 2006), o propileno glicol (Jangchud e Chinnan, 1999; Vanin et al., 2005; Jongjareonrak et al., 2006) e o polietileno glicol (Jangchud e Chinnan, 1999; Vanin et al., 2005). Entretanto, o caráter hidrofílico desses plastificantes contribui para o aumento da susceptibilidade de filmes biodegradáveis às condições ambientais.

Os plastificantes hidrofílicos possuem a habilidade de se inserirem entre as cadeias protéicas e romper as ligações de hidrogênio, as quais são responsáveis pela estabilização da rede protéica (Gontard et al., 1993).

Plastificantes com menores tamanhos de moléculas são mais eficientes para interagirem com as moléculas da proteína e a diferença na eficiência de plastificação entre os diferentes tipos de plastificantes possivelmente deve-se a diferentes disponibilidades de átomos de oxigênio na formação das ligações de hidrogênio (Sothornvit e Krochta, 2001).

O glicerol (Fig. 1) possui baixa massa molar e vem sendo amplamente utilizado no processamento termoplástico de proteínas (Redl et al., 1999; Zhang et al., 2001; Pommet et al., 2003b; Sothornvit et al., 2007). Seu alto efeito plastificante é atribuído a facilidade com a qual o glicerol tem de se inserir e posicionar-se na rede protéica tridimensional (Cuq et al., 1998; di Gioia e Guilbert, 1999).

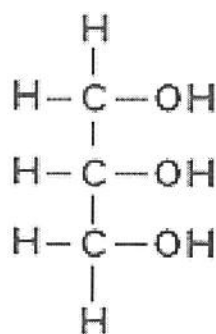


Fig. 1. Estrutura do glicerol.

2.3.2.2. Plastificantes hidrofóbicos

Exemplos de plastificantes não solúveis em água e utilizados em filmes para recobrimento de fármaco são o ftalato de dibutila (Frohoff-Hülsmann et al., 1999; Heng et al., 2003), citrato de acetiltrieta (Wang et al., 1997; Heng et al., 2003), citrato de acetiltributila (Wang et al., 1997; Heng et al., 2003) e citrato de tributila (Felton et al., 1995).

Dentre estes plastificantes, os ésteres de citratos, que são derivados naturais do ácido cítrico (Labrecque et al., 1997), não apresentam toxicidade e são aprovados como aditivos em plásticos para aplicação médica, produtos de higiene pessoal e em contato com alimentos (Rahman e Brazel, 2004). Além disso, apresentam rápida biodegradabilidade (Rahman e Brazel, 2004), demonstrando grande potencial para aplicação na produção de filmes biodegradáveis à base de macromoléculas naturais.

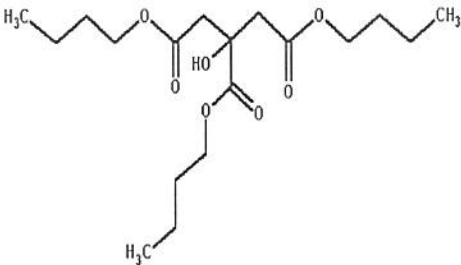
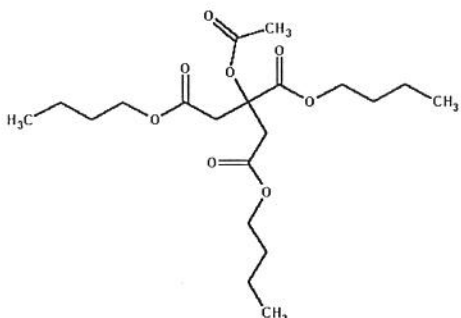
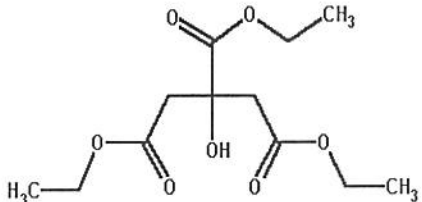
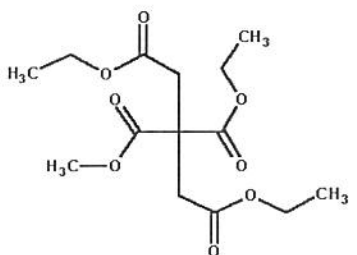
Labrecque et al. (1997) verificaram que o uso dos plastificantes citrato de tributila, citrato de O-acetiltributila, citrato de trieta, citrato de O-acetiltrieta na produção de filmes extrusados à base de poli(vinil álcool) provocou redução da temperatura de transição

vítrea desse filme. Esses autores também observaram que o aumento da concentração desses plastificantes provocou uma redução da resistência e aumento da flexibilidade dos filmes, de maneira similar ao comportamento normalmente observado em filmes comestíveis e/ou biodegradáveis plastificados com polióis (Cho e Rhee, 2002; Vanin et al., 2005; Sobral et al., 2005).

Devido ao caráter hidrofóbico característico dos plastificantes derivados do citrato (Tabela 2 e Tabela A.II, Anexo II), esses plastificantes podem apresentar grande potencial de plastificação em proteínas, compostas por partes hidrofílicas e hidrofóbicas, apesar de possuírem reduzida solubilidade em água.

No entanto, o uso de compostos com características hidrofóbicas na produção de filmes biodegradáveis protéicos, pode gerar falta de compatibilidade entre os compostos utilizados, devido à diferença de polaridade existente entre eles. Seria necessária a incorporação de um agente tensoativo que promova a miscibilidade desses compostos, e garanta ao mesmo tempo, a formação de um filme com rede coesa e homogênea, sem que haja separação de fases (exudação) entre o material hidrofóbico e a matriz hidrofílica durante o processo de secagem do filme. Dessa forma, a inclusão de um agente tensoativo, conhecido também como surfactante, pode ser necessária à produção de filmes biodegradáveis com plastificantes hidrofóbicos.

Tabela 2. Características dos plastificantes derivados do citrato.

<i>Plastificante</i>	<i>Fórmula química</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Massa molar (Da)</i>	<i>Solubilidade (%)</i>
Citrato de tributila	$C_{18}H_{32}O_7$		360,4	< 0,1
Citrato de acetiltributila	$C_{20}H_{34}O_8$		402,5	< 0,1
Citrato de trietila	$C_{12}H_{20}O_7$		276,3	5,5
Citrato de acetiltriethyla	$C_{14}H_{22}O_8$		318,3	0,72

Fonte: Labrecque et al. (1997); Vertellus, 2010.

2.3.3. Surfactante

Surfactantes são agentes que possuem atividade superficial, tendo um grupo em sua molécula classificado como liofóbico (“cabeça”), devido a sua pouca atração pelo solvente

e, um grupo liofílico (“cauda”), assim chamado por apresentar forte atração pelo solvente (Rosen, 1989; McClements, 1998). Os surfactantes possuem duas propriedades fundamentais, sendo a primeira relacionada à rápida capacidade de absorção nas interfaces, formando emulsões homogêneas e, a segunda é a tendência de se associar para formar estruturas organizadas e reduzir a tensão interfacial (Porter, 1991; McClements, 1998). O balanço entre os dois grupos (hidrofílico e hidrofóbico) governa a funcionalidade do surfactante na interface entre dois líquidos imiscíveis e podem, portanto, ser incorporados à produção de filmes biodegradáveis para reduzir a tensão superficial da solução e aumentar a adesão do mesmo, ao mesmo tempo em que pode influenciar as propriedades funcionais dos filmes formados (Rodríguez et al., 2006).

Os surfactantes baseados em lipídios possuem grande utilização na indústria alimentícia, podendo-se citar: pequenas moléculas surfactantes (como Tweens, Spans, sais de ácidos graxos) e os fosfolipídios (como a lecitina) (Erickson, 1998; McClements, 1998).

O grupo hidrofílico é classificado como aniônico, catiônico, não iônico ou anfótero. Os surfactantes, normalmente, utilizados na indústria alimentícia são não iônicos como, por exemplo, monoacilgliceróis, ésteres de sacarose, Tweens e Spans; aniônicos (ácidos graxos) ou anfóteros (lecitina). Os aniônicos possuem como grupo hidrofílico um radical com carga negativa, nessa classe encontram-se os sabões e detergentes comuns. Os surfactantes catiônicos possuem como parte hidrofílica da cadeia os cátions da molécula, ou seja, quem interage com a água será a porção com caráter positivo. Os classificados como anfóteros são caracterizados por apresentarem, na mesma molécula, grupos hidrófilos positivo e negativo, e por isso podem assumir caráter catiônico ou aniônico dependendo do pH do meio. Finalmente, os surfactantes não-iônicos são caracterizados por possuírem grupo hidrofílico sem cargas elétricas ligadas à cadeia graxa, interagindo com as moléculas

de água por meio de ligações de hidrogênio (Rosen, 1989).

O grupo hidrofóbico consiste de uma ou mais cadeia hidrocarbônica, contendo de 10 a 20 átomos de carbono por cadeia. As cadeias podem ser saturadas ou insaturadas, lineares ou ramificadas, alifáticas ou aromáticas (McClements, 1998).

Quando uma molécula de surfactante é colocada em uma interface ar-água, uma absorção das moléculas do surfactante é produzida na superfície da água. Esse fato acarreta na diminuição da tensão superficial da água, por consequência, ocorre redução do nível de energia livre superficial do sistema. Com a adição do surfactante, deve haver moléculas suficientes para que ocorra a saturação da interface ar-água e, durante a saturação, a tensão superficial permanecerá constante, independente de mais acréscimo do surfactante. A partir desta concentração as moléculas não têm mais espaço na interface e, começam a formar agregados, também conhecidos por micelas; essa concentração que promove a formação de micelas é denominada de concentração micelar crítica (Porter, 1991; Erickson, 1998; McClements, 1998).

A formação de micelas é importante, uma vez que possuem alto poder solubilizante. Atingida a concentração micelar crítica, a propriedade de solubilização do surfactante aumenta consideravelmente, graças à penetração do hidrocarboneto (porção hidrofóbica) no interior das micelas (modelo de Stigter). A solubilização provocada pelas micelas, permitirá a dissolução do óleo em água ou vice-versa e, essa dissolução pode ser traduzida por meio da medida da afinidade de um surfactante para óleo ou para água, identificada pelo Balanço Hidrófilo-Liófilo (HLB). Os valores de HLB auxiliam na classificação do surfactante e indicarão o tipo de emulsão que se espera, sendo que valores abaixo de nove agrupam surfactantes do tipo lipofílico, valores acima de onze, surfactantes hidrofílicos, e valores entre nove e onze, os surfactantes são considerados intermediários. Para emulsões do tipo

água em óleo, são recomendados surfactantes com valores de HLB entre 3 e 6, enquanto que para emulsões óleo em água, recomenda-se valores entre 8 e 18 (O'Brien, 1998; McClements, 1998).

2.3.3.1. Lecitina

A lecitina é um fosfolipídio de origem vegetal podendo ser obtida na primeira etapa da refinação do óleo de soja durante o processo de degomagem. É um surfactante anfótero natural, amplamente usado como surfactante em diferentes tipos de produtos alimentícios (Schneider, 1997). A composição típica da lecitina está apresentada na Tabela 3 e características adicionais podem ser vistas no Anexo III.

Tabela 3. Composição aproximada de lecitina de soja natural comercial.

<i>Componente</i>	<i>Conteúdo</i>
Óleo de soja	35%
Fosfatidil colina	16%
Fosfatidil etanolamina	14%
Fosfatidil inositol	10%
Fitoglicolipídios	17%
Carboidratos	7%
Umidade	1%

Fonte: Dorsa (2004).

Os fosfolipídios podem ser considerados como diésteres de ácido fosfórico assimétrico, com ligações químicas de três tipos: entre carbonos, ligação de éster e pontes de fosfoéster. Pode também ser considerada como uma molécula com quatro tipos de componentes: ácidos graxos, uma cadeia de glicerol (onde estão ligados os ácidos graxos), um fosfato e um álcool podendo ser colina, etanolamina (2-aminoetanol) ou inositol, conforme apresentada na Fig. 2 (Schneider, 1997; Erickson, 1998).

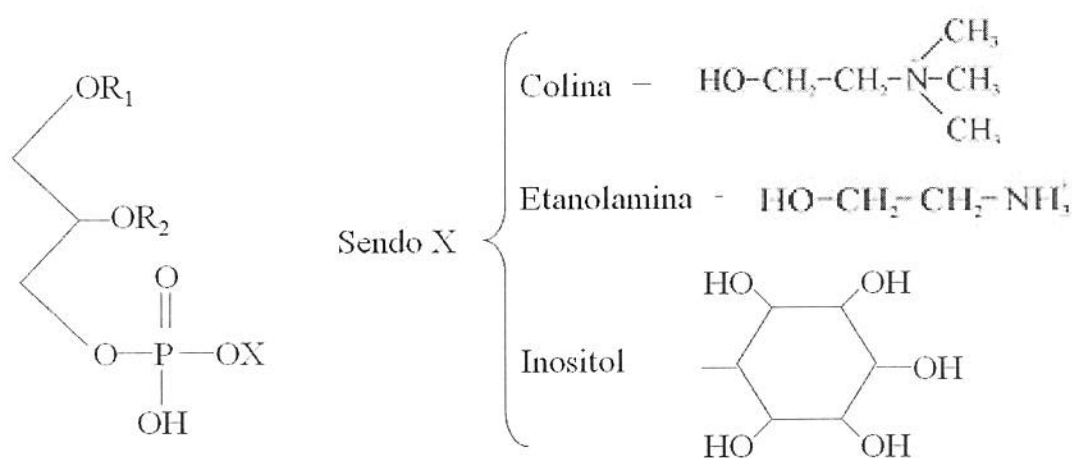


Fig. 2. Estrutura básica dos fosfolipídios da lecitina de soja. R₁ e R₂ representam os níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados (Schneider, 1997; Erickson, 1998).

O processo de obtenção pode gerar uma variedade de lecitinas, sendo classificadas como: natural, refinadas e quimicamente modificadas. As lecitinas isentas de óleo são produzidas pela extração com acetona do óleo de soja da lecitina natural. Enquanto que, o fracionamento com álcool de lecitina isenta de óleo pode ser empregada para a obtenção de uma fração solúvel em álcool, com alto teor de fosfatidil colina e, uma fração não solúvel em álcool, com alto teor de fosfatidil inositol. As lecitinas quimicamente modificadas incluem produtos hidrogenados, hidroxilados, acetilados, sulfonados e halogenados. As modificações são feitas para modificar as propriedades emulsificantes das lecitinas e

aumentar a dispersabilidade em fase aquosa (Dorsa, 2004). Alguns valores de HLB, para diferentes tipos de lecitina, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de HLB para produtos fosfolipídios comerciais.

<i>Produto</i>	<i>HLB</i>
Lecitina de soja crua	3
Lecitina de soja isenta de óleo	4
Lecitina do ovo isenta de óleo	5
Lecitina de soja hidrolisada	7
Lecitina de soja acetilada	8
Lecitina de soja hidroxilada	8
Lecitina de soja acetilada e hidrolisada	9-10

Fonte: Schneider (1997).

2.3.3.2. Saponinas

O primeiro composto pertencente ao grupo dos saponósidos foi designado por saponina, por ter sido isolado da saboeira (*Saponaria officinalis* L.), planta que era empregada na lavagem de roupas. Quimicamente as saponinas são heterósidos de genina, que possui uma parte com característica hidrofóbica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (cadeia de açúcares), esse caráter anfifílico garante a capacidade de reduzir a tensão superficial da água, o que explica sua ação detergente, emulsificante e de formação de espuma. Possuem elevada massa molar e formam misturas complexas devido ao número variado de açúcares presentes em sua molécula (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Schenkel

et al., 2007).

As saponinas são classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou, pelo caráter ácido, básico ou neutro. De acordo com o núcleo de aglicona, as saponinas são denominadas esteroidais (Fig. 3), possuem um esqueleto com 27 C em um sistema tetracíclico, apresentam grande importância farmacêutica, pois atuam como precursores para a síntese de compostos esteroidais (hormônios, contraceptivos, diuréticos entre outros) ou saponinas triterpênicas (Fig. 3), possuem um esqueleto com 30 C em um sistema pentacíclico. Em geral a aglicona é formada por um oligossídeo linear que pode conter glucose, galactose, arabinose, xilose, ácidos glucurônico e galacturônico. O caráter ácido e neutro pode ser devido à presença de um agrupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares ou em ambos, enquanto que o caráter básico decorre da presença de nitrogênio, que contém amina secundária ou terciária, ou glicosídeos nitrogenados esteroidais (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Schenkel et al., 2007).

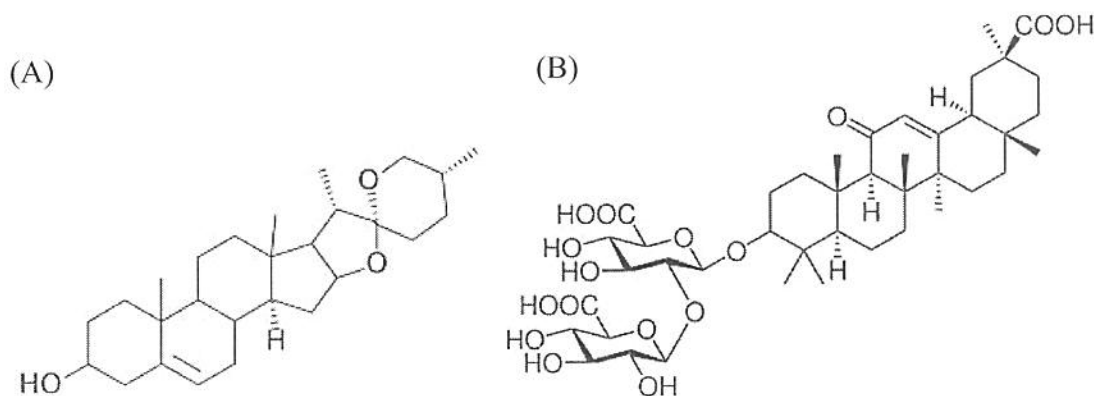


Fig. 3. Estrutura das saponinas (A) esteroidal e (B) triterpênica.

Outra classificação refere-se ao número de cadeias de açúcares ligadas na aglicona. Quando há apenas uma cadeia de açúcares ligada à hidroxila C-3 é chamada de saponina monodesmosídica (Fig. 4A) e, quando possuem duas cadeias de açúcares são denominadas

bidesmosídicas (Fig. 4B). A maioria dessas cadeias de açúcares estão ligadas ao éter na hidroxila em C-3 e a outra com ligação éster (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Wina et al., 2005).

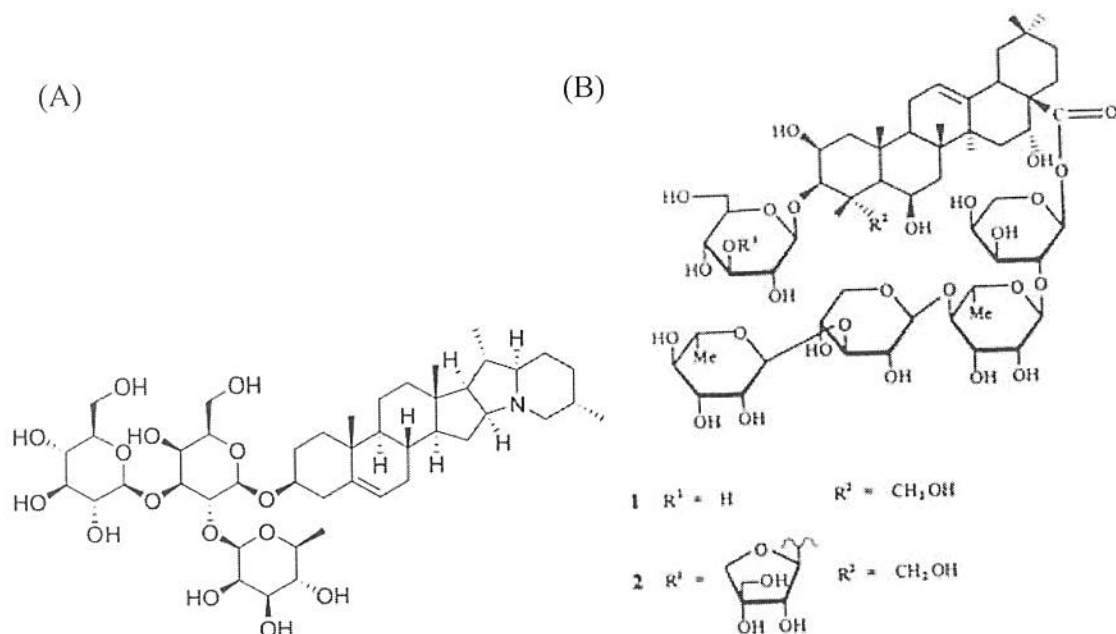


Fig.4. Estrutura das saponinas (A) esteroidal momodesmosídica e (B) triterpênica bidesmosídica.

As saponinas são substâncias que estão presentes em pelo menos 400 espécies de plantas, das quais muitas são utilizadas como fonte de alimentação ou aditivos na nutrição de ruminantes e, também podem ser encontradas em alguns animais, dentre eles o pepino do mar (Wina et al., 2005). Nas plantas ocorrem em diferentes partes como a raiz, tubérculo, casca, folhas, sementes e frutos. Dentre as plantas comestíveis as saponinas podem ser encontradas na soja, feijão, alho, cebola, tomate, aspargo, espinafre entre outras e, em plantas usadas na alimentação animal encontra-se as saponinas na alfafa, girassol, plantas forrageiras, gramíneas entre outras. As saponinas triterpênicas são encontradas em maior abundância na natureza do que as esteroidais e ocorrem principalmente nas

dicotiledôneas, enquanto que as saponinas esteroidais ocorrem nas monocotiledôneas, categoria que abrange as gramíneas (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Schenkel et al., 2007).

Muitas fontes de saponinas têm sido comercialmente usadas, porém atualmente apenas duas são permitidas como aditivos em alimentos: os extratos de *Quillaya saponaria* (quilaia) e *Yucca schidigera* (yucca), contendo saponinas triterpênicos e esteroidal, respectivamente. Elas são classificadas como GRAS (Generally Recognized As Safe), ou seja, produtos que podem ser utilizados sem efeito nocivo (Oleszek et al., 2001a e b) e como aditivos alimentícios na seção US 172.50 (Natural Flavoring Substances and Natural Substances Used in Conjunction with Flavors) (US Food and Drug Administration, 2003). Na Inglaterra o uso do extrato de quilaia é permitido desde 1962 em bebidas e seu uso como espumante não deve ultrapassar mais que 20 ppm por peso. Esses dois extratos também são permitidos nos Estados Unidos da América (EUA) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos e bebidas (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007).

Yucca schidigera

A *Yucca schidigera* (yucca) é uma planta endêmica podendo ser encontrada em 47 espécies vegetais do gênero *Yucca*, que se encontram distribuídos desde o norte dos EUA até a América do Sul. Entretanto a *Yucca schidigera* cresce somente na Baixa Califórnia, no México, no sudoeste de Nevada e Arizona, e na parte central e sul da Califórnia nos EUA, conhecida como o deserto de Mojave. Quando a planta atinge a idade adulta os galhos maduros, por volta de 1 a 2 metros, são colhidos, enquanto o tronco principal permanece e produz novos galhos em um período de 4 a 5 anos. Os galhos maduros colhidos são

submetidos a um processamento. Primeiramente são moídos e o sólido resultante é seco e transformado em pó, já o líquido é utilizado para produzir um suco concentrado (Cheeke, 2000; Piacente et al., 2004).

A yucca contém saponinas esteroidais, numa porcentagem aproximada de 10%, constituintes fenólicos e possui atividade antioxidante (Oleszek et al., 2001a e b; Piacente et al., 2004). Características adicionais sobre o extrato de yucca podem ser observadas no Anexo III.

O uso da yucca é descrito desde o tempo antigo pela cultura indígena, seja como alimento, remédio natural ou como sabão. Atualmente, seu extrato é usado na medicina natural, na indústria de cosméticos é usado como surfactante e conservante. O concentrado líquido (extrato de yucca) ainda é utilizado na indústria de refrigerantes como flavorizante, agente espumante e potencializador de sabor na indústria de bebidas e alimentos. Na agricultura é também utilizado, devido a sua propriedade surfactante, em tratamentos de solos, pois interage com as células das raízes das plantas aumentando a absorção de água e nutrientes e atua como promotor biológico, uma vez que interage com a microflora circundante, criando uma rizosfera mais favorável para a planta. São consideradas, na agricultura, agentes de controle de estresse e promotores de crescimento da planta. Na área de nutrição de animais, é utilizada como aditivo para alimentos de animais nas indústrias avícolas, suínas e bovinas. Pode ser adicionada a ração, na forma de pó, durante todo o ciclo produtivo, diminuindo os níveis de emissão de gases nocivos, principalmente a amônia, melhorando a conversão alimentar, ganho de peso e produtividade dos animais. Adicionalmente também pode ser usada como aditivo no tratamento de águas residuais e na redução de amônia, sulfeto de hidrogênio e maus odores (Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007; Cheeke, 2000).

Devido ao seu caráter anfífilo e sua capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídios de membranas, podem atuar sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade. Possui atividades hemolítica, ictiotóxica, molusquicida, anti-helmítica, ação espermicida, forma complexo com colesterol e, portanto tem a capacidade de reduzir os níveis de colesterol sérico, ação hipocolesteremiante, atividade antiinflamatória e antiviral (Cheeke, 2000; Güçlü-Üstündağ e Mazza, 2007).

2.4. Processamento de filmes biodegradáveis

A formação dos filmes geralmente envolve associações inter e intramolecular ou ligações cruzadas de cadeias de polímeros formando uma rede tridimensional semi-rígida (Tharanathan, 2003). São dois os tipos de forças importantes na formação de filmes: força de adesão, indicada pela interação entre as moléculas constituintes do biopolímero e o suporte, que está relacionada à resistência à separação do filme ou cobertura no ponto de contato e; forças de coesão, indicada pela interação entre as moléculas do biopolímero e está relacionada com a capacidade de formação de superfícies contínuas fortemente ligadas (Kester e Fennema, 1986; Tharanathan, 2003).

Existem vários processos pelos quais os filmes e coberturas comestíveis são fabricados, dentre os principais mecanismos de produção, de acordo com Debeaufort et al. (1998), estão: (1) Fusão e solidificação de gorduras sólidas, ceras ou resinas, (2) Gelificação térmica ou coagulação, que consiste no aquecimento da solução das macromoléculas, as quais sofrem desnaturação, gelificação e precipitação, ou ainda devido a um rápido resfriamento de uma dispersão de hidrocolóides que induz a transição sol-gel, (3) Coacervação simples, quando o hidrocolóide disperso na solução aquosa é precipitado

ou gelificado pela remoção do solvente, seja pela adição de um soluto não eletrolítico na qual o polímero não é solúvel, seja pela adição de uma substância eletrólita induzindo um efeito *salting out*, ou ainda pela modificação do pH da solução, (4) Coacervação complexa, quando duas soluções de hidrocolóides com cargas opostas são combinadas, induzindo interações e precipitação da mistura polimérica.

A técnica denominada *casting* é a forma mais utilizada na produção de filmes biodegradáveis e consiste de uma solução que é despejada sobre um suporte de área conhecida e deixada em repouso até que haja a evaporação do solvente e conseqüentemente desidratação do material, ocorrendo a formação do filme.

Em processos industriais, técnicas que são usadas na elaboração de materiais plásticos sintéticos flexíveis podem ser transportadas para a produção de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis e dentre essas técnicas pode-se citar a extrusão, moldagem por compressão, injeção e sopro (Liu et al., 2006; Verbeek e van den Berg, 2010). Operacionalmente a técnica por *casting* envolve várias etapas de processamento o que pode encarecer a produção de filmes biodegradáveis, enquanto que, por exemplo, a extrusão exige apenas uma etapa e proporciona alta velocidade de processamento (Herald et al., 2002).

Independente do tipo de processamento que se busca na elaboração de filmes biodegradáveis um aspecto é sempre levado em consideração pelos pesquisadores: que os filmes formados sejam flexíveis e resistentes e apresentem boas propriedades de barreira ao vapor de água. Dentre essas características a propriedade de barreira ao vapor de água é considerada uma das mais importantes para a aplicação desse tipo de material em alimentos, pois dependendo da taxa de transferência do vapor de água, podem ser iniciados processos de deterioração nos alimentos embalados. Por exemplo, se a pressão diferencial

de vapor de água na superfície do alimento é maior que a umidade relativa do ambiente circundante, ocorre uma desidratação a qual será responsável por perdas nas características de textura e organolépticas do alimento. Por outro lado, numa situação inversa, a transferência das moléculas de vapor de água do ambiente para o alimento pode criar condições favoráveis de crescimento microbiano e também proporcionar perda de textura (Martín-Polo et al., 1992; Labuza, 1982). Dessa forma, a adição de substâncias hidrofóbicas ou a indução de modificações químicas e/ou enzimáticas na estrutura polimérica de forma a reduzir a susceptibilidade do material a umidade ambiente são alternativas a serem investigadas.

2.4.1. Adição de substâncias hidrofóbicas

A adição de compostos com caráter hidrofóbico pode ser realizada através da superposição de camadas (filmes bicamadas ou multicamadas) ou pela formação de uma emulsão (Donhowe e Fennema, 1994). A afinidade de compostos hidrofóbicos com a proteína dependerá fortemente de como a molécula lipídica estará associada a essa proteína, se estará de forma isolada formando glóbulos dispersos pela matriz ou se estará incluída como uma monocamada, bem como dependerá da estrutura e polaridade do lipídeo e da proteína, da relação molecular entre esses dois compostos, das condições ambientais, pH, força iônica, viscosidade, temperatura entre outros fatores (Callegarin et al., 1997).

2.4.1.1. Filmes bicamadas

Para a formação desse tipo de filme ocorre a deposição de uma camada lipídica,

previamente fundida ou solubilizada em um solvente adequado, sobre uma camada de filme a base de um hidrocolóide e essa camada serve como um suporte para a obtenção de filmes bicamadas ou multicamadas (Debeaufort et al., 2000). A eficiência de barreira de filmes bicamadas é da mesma ordem de magnitude que os filmes puramente lipídicos ou filmes plásticos convencionais e caracteriza-se por ser bem menos permeável ao vapor de água que filmes emulsionados (Morillon et al., 2002).

Apesar das boas condições de barreira ao vapor de água apresentada pelos filmes bicamadas, esses possuem o inconveniente de requererem mais de uma etapa de secagem, podendo encarecer o processo de elaboração. Suas propriedades funcionais dependem do tipo de laminação que é utilizado na formação de filmes bicamadas (ou multicamadas), ou seja, se uma camada não possuir boa e contínua aderência com a outra camada, pode prejudicar as propriedades mecânicas, resultando em baixos valores de tensão na ruptura e alongamento (Quezada-Gallo et al., 2000; Morillon et al., 2002).

Chen et al. (2010) produziram filmes bicamadas a base de amido de tapioca, goma da folha “*hsian-tsao*” e surfactante éster de sucrose. Estes filmes apresentaram excelentes propriedades de barreira ao vapor de água com valores entre 0,0048 e 0,0189 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹, porém os resultados de tensão na ruptura mostraram que esses filmes foram fracos. Os valores de tensão na ruptura não ultrapassaram 35 MPa além de, pouco flexíveis, com média de alongamento de 2,83%. Os autores também observaram durante a análise de isotermas de sorção de água, um descolamento parcial entre as camadas quando 5% de éster de sucrose foi utilizado. A incorporação de cera de abelha em filmes bicamadas a base de pululana e caseinato de sódio promoveu uma redução na permeabilidade ao vapor de água de 136 vezes comparado ao filme sem cera de abelha (Kristo et al., 2007). Esses autores observaram decréscimo de 40 a 14 MPa na tensão de ruptura quando a laminação

com cera de abelha foi utilizada. Na produção de filmes bicamadas a base de glúten de trigo, Gontard et al. (1995) observaram que dentre os lipídios utilizados, as ceras de abelha, de parafina e de carnaúba foram as que mais promoveram a redução na permeabilidade ao vapor de água.

2.4.1.2. Filmes emulsionados

Uma emulsão consiste em um sistema coloidal heterogêneo onde ocorre a mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo um deles disperso em forma de partículas no outro e para a estabilização da emulsão se faz necessário o uso de um agente surfactante ou tensoativo (Callegarin et al., 1997).

Filmes emulsionados são estruturados como uma matriz hidrocolóide contínua com partículas de surfactantes dispersas dentro e sobre a superfície do filme, e a difusão de moléculas de água ocorre através da fase hidrocolóide contínua (Villalobos et al., 2006). Kamper e Fennema (1984) produziram filmes emulsionados de hidroxipropilmetilcelulose, polietileno glicol e ácidos esteárico e palmítico com permeabilidade ao vapor de água menor que a obtida para filmes bicamadas, os valores obtidos foram, 0,0018 e entre 0,068 e 0,101 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹, respectivamente para filmes emulsionados e bicamadas. Essa diferença na PVA, segundo esses autores, é possivelmente devido a orientação das moléculas dos ácidos graxos. No caso do filme bicamada, o ácido graxo foi simplesmente depositado sobre a superfície seca da camada filmogênica composta pelo hidroxipropilmetilcelulose e polietileno glicol. Enquanto que no filme emulsionado, a orientação do ácido graxo na interface ar-água da solução formadora de filme é feita antes que os lipídios se solidifiquem na superfície do hidrocolóide. Por outro lado, Martín-Polo et

al. (1992) e Debeaufort et al. (1993) obtiveram resultados opostos, onde a permeabilidade ao vapor de água foi menor em filmes a base de metilcelulose e cera de parafina em filmes preparados pela técnica de bicamadas em relação aos filmes emulsionados. Debeaufort et al. (1993) afirmaram que os filmes laminados possuem de 10 a 1000 vezes maior eficiência contra a transferência ao vapor de água do que os filmes emulsionados. Morillon et al. (2002) apresentaram uma extensa revisão sobre o uso de compostos hidrofóbicos na produção de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis para obtenção de maior eficiência de barreira ao vapor de água. Wang et al. (2009) concluíram que o ajuste de pH e o uso de óleo de milho em filmes a base de gelatina foram fatores importantes no controle da permeabilidade ao vapor de água, onde o menor valor obtido foi de $2,1 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ para pH 7 e 55,2% de óleo de milho na formulação. De acordo com Chen et al. (2009) a propriedade de barreira ao vapor de água de filmes emulsionados a base de amido de tapioca e goma da folha “hsian-tsao” foi promovida significativamente pela adição de surfactantes, ao mesmo tempo em que induziu a redução da tensão na ruptura, onde foram observados valores mínimos de PVA da ordem de $0,036 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ (Chen et al., 2009). Esses autores afirmaram que a redução da PVA devido a adição de surfactantes deveu-se a interações de ligações de hidrogênio entre a fase hidrocolóide e a porção polar do surfactante, reduzindo assim o número de grupos polares disponíveis para interagir com as moléculas de água.

2.4.2. Modificações químicas e/ou enzimáticas

A introdução de ligações cruzadas (*cross-links*) dentro ou entre as cadeias protéicas seja por modificações enzimáticas ou químicas é vista como alternativa para a promoção de

uma melhor estruturação e ordenação da matriz polimérica que pode resultar em melhores propriedades funcionais dos filmes (Guilbert, 1986). Dessa forma, agentes de *crosslinking* podem ser usados para melhorar a resistência a água, coesão, rigidez, as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis, e o aumento da coesão entre as cadeias protéicas é um dos responsáveis pela melhora na funcionalidade dos filmes (Galiotta et al., 1998; Marquié et al., 1995).

Tratamentos enzimáticos de ligações cruzadas com transglutaminase ou peroxidases podem ser utilizados para estabilizar filmes a base de proteínas, no entanto, a disponibilidade limitada da transglutaminase e o alto custo de produção desse tipo de filme têm reduzido seu uso potencial em filmes comestíveis (Galiotta et al., 1998). Os agentes químicos mais comuns de ligações cruzadas são glutaraldeído, gliceraldeído, formaldeído, gossipol, e ácidos tânico e láctico (Marquié et al., 1995).

Modificações em filmes a base de gelatina foram eficientes na redução da PVA, sendo observados decréscimos aproximados de 40% para modificação enzimática com transglutaminase, de 22% para modificação química com formaldeído e de 12% para a adição de glioxal. No entanto, não foi observada melhoria nas propriedades mecânicas, embora o uso de formaldeído tenha resultado em aumento significativo da tensão na ruptura (Carvalho e Grosso, 2004).

Sztuka et al. (2009) estudaram o efeito de compostos hidrofóbicos sobre a PVA de filmes a base de gelatina de peixe com ou sem modificação com transglutaminase ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboiimida (EDC) e observaram que a PVA de filmes modificados enzimaticamente com a presença de lecitina e óleo de colza e lanolina foram respectivamente 60% e 47% menor do que em filmes sem a adição dos compostos hidrofóbicos.

Galiotta et al. (1998) observaram que a adição de formaldeído em filmes a base de proteínas do soro de leite induziu a alterações nas propriedades mecânicas, com aumento na tensão de ruptura e no módulo de elasticidade e redução da solubilidade em água da proteína, devido a formação de ligações covalentes. Marquié et al. (1995) também observaram a melhoria nas propriedades mecânicas de filmes protéicos de sementes de algodão através de modificações químicas com gossipol, formaldeído e glutaraldeído.

2.4.3. Processamento termoplástico

2.4.3.1. Extrusão

De acordo com Riaz (2000) a extrusão de alimentos é um processo no qual o material é forçado a um escoamento, sob uma ou mais condições de mistura, aquecimento e cisalhamento, através de uma matriz a qual é desenhada para dar forma ao material extrusado e/ou para impedir a expansão e perda de evaporação excessiva do material na saída do equipamento. Extrusores podem ser usados para o cozimento, mistura, texturização, e dar forma aos produtos alimentícios.

O primeiro uso comercial de uma extrusora de rosca simples data da década de 20 e tinha como objetivo a produção de macarrão. Nessa época, o produto ainda não era cozido, porém a umidade da massa e a força mecânica já eram suficientes para moldar o produto quando este era comprimido contra uma forma vazada. As primeiras extrusoras de rosca simples com cozinhamento surgiram em meados dos anos 40 para a fabricação de *snacks* a base de milho (Heldman e Singh, 1981). Esses autores definiram o cozinhamento através da extrusão o processo no qual, amidos e/ou proteínas adquirem consistência plástica e

cozinham através da combinação de ações de umidade, pressão, temperatura e cisalhamento mecânico.

Pode-se definir a extrusão como um processo de tratamento térmico de “High Temperature Short Time” (HTST) ou Alta Temperatura por Curto Espaço de Tempo, que por combinação de calor, umidade e trabalho mecânico, modifica profundamente as matérias-primas, dando-lhes novas formas, estruturas e características funcionais e nutricionais (Manrich, 2005). Temperaturas muito elevadas tendem a diminuir a viscosidade do material e podem prejudicar a formação do perfil desejado, além de gerar degradação em alguns casos. Já em temperaturas muito baixas o manuseio se torna difícil e há geração de uma massa heterogênea e um produto extrusado normalmente sem qualidade (Manrich, 2005).

Pode-se afirmar também que um extrusor desempenha a função de um reator químico no processamento de biopolímeros ou de alimentos em condições de altas temperaturas (até 250°C), altas pressões (até 25 MPa), num tempo de residência curto (1 a 2 min), nessas condições, durante o processo ocorre a abertura das estruturas terciárias e quaternárias de proteínas resultando na quebra e rearranjo das ligações de hidrogênio e dissulfetos, permitindo a plastificação e a formação de texturas desejáveis (Olkku e Linko, 1977).

Como vantagens do processo de extrusão, segundo Smith (1969), pode-se citar: adaptabilidade e versatilidade (a partir da troca de ingredientes e alterações das condições de processo pode-se obter uma grande variedade de produtos), alta qualidade e uniformidade dos produtos; minimiza a degradação de nutrientes alimentícios enquanto que melhora a digestibilidade das proteínas (por desnaturação) e de amidos (por gelatinização); a alta temperatura utilizada no processo também destrói os componentes antinutricionais

(inibidores de tripsina e enzimas não desejáveis, tais como lipases, lipoxidases e microrganismos); o processo tem baixos custos e alta produtividade em relação a outros processos de cocção; requer menos espaço por unidade de operação que os sistemas tradicionais de cocção; alta velocidade de produção; automação de processo; eficiência energética e ausência de efluentes.

No fim da descarga da zona de mistura, o material extrusado chega ao máximo de compactação, e a pressão e temperatura exercidas sobre o material fazem com que seja expelido para formar o produto final, na textura, densidade, cor e propriedades funcionais desejadas (Riaz, 2000; Manrich, 2005).

Os principais fenômenos que ocorrem durante a extrusão são físicos, físico-químicos, químicos e microbiológicos (Cheftel, 1986). Os físicos incluem transporte do material, que depende do tipo e geometria do mesmo, dimensões e configuração da rosca, dimensão do cilindro, velocidade rotacional do eixo e tipo e desenho da matriz. Incluem ainda a fusão e plastificação sofridas pelo material; o cisalhamento, que depende do tipo de fluxo, geometria e configuração da rosca e do cilindro, do espaço entre eles e da velocidade rotacional da rosca; atrito o qual ocorre entre o material e o equipamento e entre as partículas do material; transferência de calor que ocorre do material para o equipamento e do equipamento para o material; pressão que é responsável pela evaporação e expansão que ocorre no material ao sair da matriz; moldagem e expansão, que dão a configuração e tamanho ao produto. Os fenômenos físico-químicos são a plastificação, o material é transformado de sólido a fluido, com características plásticas, a desnaturação, gelatinização, aglomeração e orientação de estruturas. Em relação aos fenômenos químicos e microbiológicos pode-se incluir a caramelização e reação de Maillard, redução de fatores tóxicos, antinutricionais e de microrganismos (Cheftel, 1986).

Os extrusores podem ser classificados em monorosca ou dupla rosca e as partes fundamentais de um extrusor monorosca podem ser observadas na Fig. 5, as quais estão descritas a seguir (Manrich, 2005).

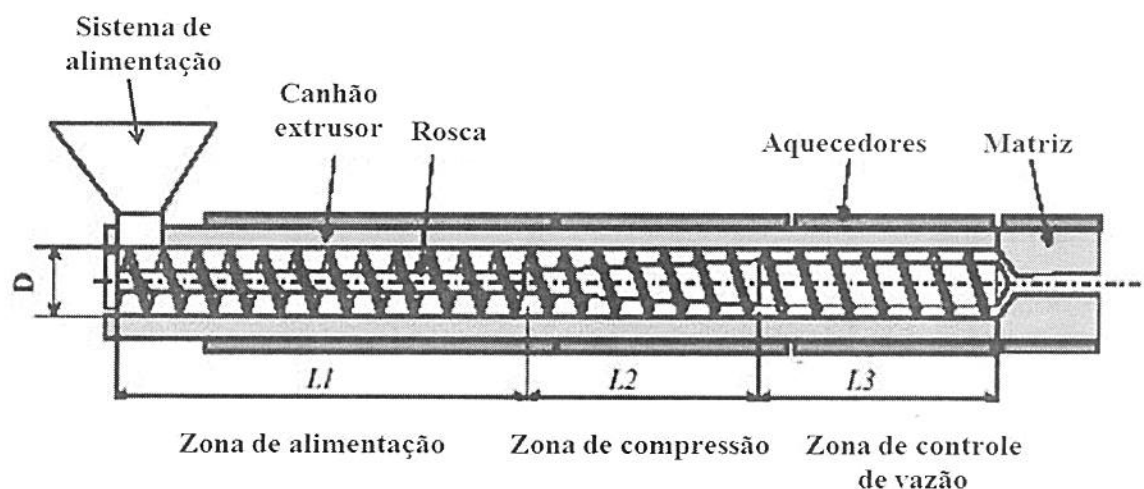


Fig. 5. Representação esquemática de um extrusor monorosca. L = distância ao longo do eixo do extrusor (Vignol, 2005).

- Sistemas de alimentação: alimentação deve ser constante e uniforme, e ser capaz de alimentar ingredientes secos, líquidos ou mistos. O sistema de alimentação contém a rosca alimentadora a qual é dotada de rotação variável, tem como função abastecer uniforme e continuamente o canhão extrusor.

- Tanque de homogeneização: quando presente, é onde ocorre a distribuição do produto à rosca alimentadora, pode ou não possuir sistema de agitação.

- Canhão extrusor: é composto por câmaras encamisadas e pelos segmentos de roscas, onde as câmaras encamisadas permitem que se modifique a temperatura do canhão ao longo do seu comprimento. As roscas podem ser do mesmo diâmetro do início ao fim do canhão, bem como ter o segmento final na forma cônica (menor diâmetro). Sua forma de

construção deve respeitar a relação entre o passo e o diâmetro da rosca, garantindo que no período de residência do produto no canhão, sejam vencidas as etapas seguintes da extrusão. Os restritores, roscas de duplo ou triplo passo e roscas cônicas podem ser utilizados para se obter maior pressão interna ou maior cisalhamento, é nesta fase que ocorrem as transformações que mais afetam as características finais do produto.

- Rosca: um dos componentes mais importantes e é responsável por transportar, fundir ou amolecer, homogeneizar e plastificar um polímero.

- Matriz: “placa” instalada no final do cilindro de formato desejado, tem as funções de dar forma desejada ao produto e restringir o escoamento, que resulta no aumento da pressão na zona de cocção.

Hernández-Izquierdo e Krochta (2008) fizeram uma ampla revisão sobre as potencialidades do uso de proteínas no processamento termoplástico. Dentre as proteínas, esses autores deram destaque ao glúten de trigo, zeína, soja, miofibrilas e soro do leite na formação de filmes usando os métodos de moldagem por compressão e extrusão. Outros exemplos de polímeros naturais que vem sendo utilizados para a fabricação de filmes biodegradáveis por meio do método da extrusão são proteína do milho, como a zeína (Ha e Padua, 2001; Herald et al., 2002; Wang e Padua, 2003), proteína de soja (Ghorpade e Hanna, 1996; Naga et al., 1996; Zhang et al., 2001; Mariani et al., 2009), proteína do soro de leite (Sothornvit et al., 2003 e 2007; Hernández-Izquierdo et al., 2008), proteína de girassol (Orliac et al., 2003), gelatina (Liu et al., 2006; Park et al., 2008; Fakhouri, 2008), glúten de trigo (Pommet et al., 2003b; Finkenstadt et al., 2008), pectina (Liu et al., 2006), amido de batata (van Soest e Knooren, 1997), amido de mandioca modificado (Sakanaka, 2007), amido de milho com e sem modificação (Domingo e Morris, 1999; Fishman et al.,

2000; Liu et al., 2005; Fakhouri, 2008; Mariani et al., 2009; Pushpadass et al., 2009), amido de ervilha modificado (Liu et al., 2005).

2.4.3.2. Extrusão a sopro

O processamento de um filme tubular na extrusão por sopro caracteriza-se pela injeção de ar no centro da matriz, permitindo a formação de uma bolha. A pressão do ar soprado determina o diâmetro do tubo formado (Fig. 6). A geometria da bolha é controlada pela velocidade do equipamento e pelo volume interno de ar. Os parâmetros de controle do processo que a espessura do filme e diâmetro da bolha, segundo Cantor (2001) são: velocidades dos rolos de arraste, velocidade da rosca, volume de ar de resfriamento e pressão de ar de sopro. Os parâmetros de processamento exercem grande influência sobre as propriedades do filme. As vantagens para a extrusão a sopro são resistência mecânica mais uniforme, propriedades físicas quase iguais em ambas as direções, fabricação de sacos plásticos em uma única operação (corte e solda).

A massa molar e sua distribuição, o tipo e a quantidade de ramificações e distribuição destas ramificações interferem no comportamento reológico do material utilizado durante o processamento, e nas propriedades finais dos filmes (Rosato e Rosato, 1988). Segundo esses autores uma alta massa molar induz a uma maior orientação que melhora as propriedades finais dos filmes, como resistência à tensão, resistência à fluência, resistência ao impacto, resistência térmica e resistência a degradação quando em contato com solventes. No geral, qualquer material termoplástico pode ser orientado e este processo ocorrerá normalmente um pouco acima da temperatura de transição vítrea.

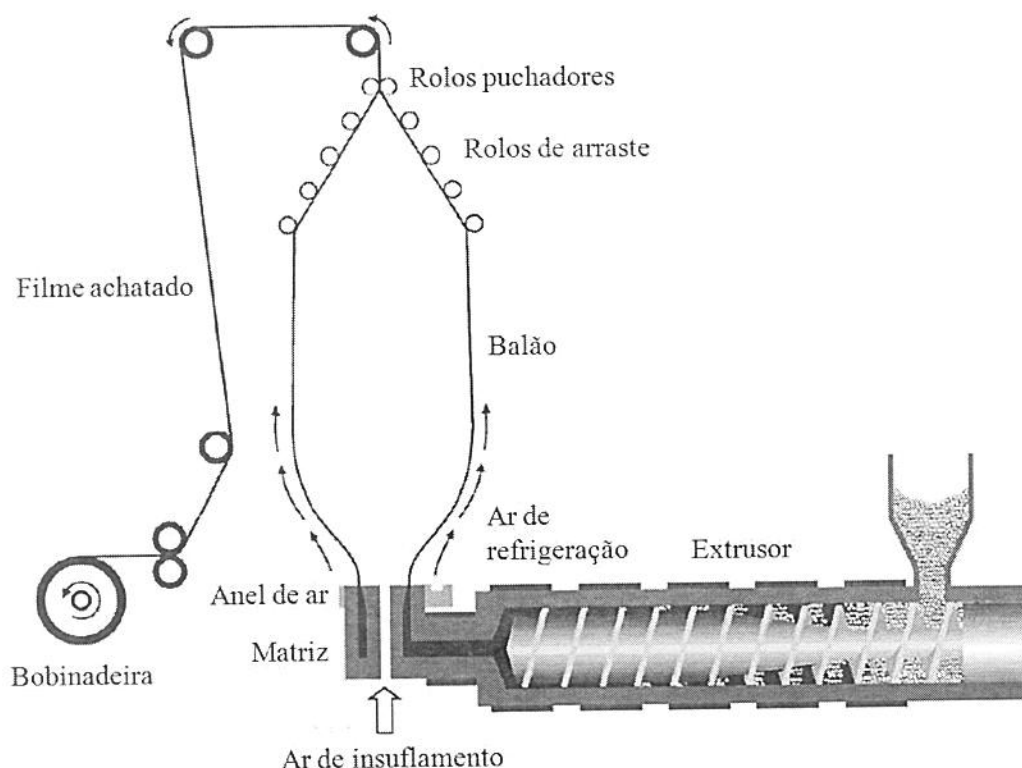


Fig. 6. Representação esquemática de uma extrusão a sopro (Lim et al., 2008).

Os processos de orientação podem ser utilizados como ferramentas na modificação das propriedades dos filmes, como mecânicas, óticas e de barreira a gases, podem alterar a espessura e a flexibilidade dos mesmos (Benning, 1983).

Wang e Padua (2003) investigaram a capacidade de uma mistura de zeína e ácido oléico ser processada em um extrusor seguido de sopro e observaram que a temperatura do canhão, temperatura do ar, taxa de alimentação e o fluxo do ar na entrada afetaram a operação. A temperatura do canhão do extrusor e do ar de entrada no sopro foram mantidas altas o suficiente para a resina se fundir, poder expandir e formar um tubo (Fig. 6). Entretanto os autores observaram que temperaturas demasiadamente altas resultaram em excessiva perda de umidade e de plasticidade do material formado. A umidade também foi um aspecto determinante na formação de filmes pela técnica de sopro. Em um teor inicial

elevado de umidade, o material extrusado apresentou grande quantidade de bolhas de água, as quais tendem a se romper facilmente, promovendo um colapso na formação do filme tubular, enquanto que baixa umidade resultou em um material seco e duro, com ausência de plasticidade.

2.5. Características e propriedades funcionais de filmes biodegradáveis

Os principais parâmetros que afetam as propriedades dos filmes biodegradáveis a base de gelatina são: fonte da matéria-prima, método de extração, massa molar, método de preparação do filme, e grau de hidratação ou presença de plastificante (Arvanitoyannis, 2002).

2.5.1. Filmes produzidos por casting

Normalmente, o aumento na concentração de plastificante adicionado à solução filmogênica produz filmes menos rígidos e mais flexíveis devido à redução de interações entre as cadeias poliméricas (Arvanitoyannis, 2002). O efeito do plastificante sobre as propriedades mecânicas já foi discutido e apresentado por Gontard et al. (1993), Cuq et al. (1997), Sothornvit e Krochta (2001), Tanaka et al. (2001), Sobral et al. (2001), Paschoalick et al. (2003), Thomazine et al. (2005) e Jongjareonrak et al. (2006) e o papel da adição de plastificantes às formulações filmogênicas também já foi descrito no item 2.3.2 desse capítulo de Revisão. O aumento na concentração do plastificante (glicerol ou sorbitol) de 25 para 55% em filmes a base de gelatina causou um acréscimo na flexibilidade, e redução na tensão de ruptura e na permeabilidade ao vapor de água (Thomazine et al., 2005). Esse é

o comportamento clássico de um plastificante hidrofílico quando inserido numa matriz polimérica para a formação de filmes biodegradáveis. Gil et al. (2006), Labrecque et al. (1997) e Wang et al. (2008) também observaram redução na tensão de ruptura e aumento no alongamento quando plastificantes hidrofóbicos foram utilizados, respectivamente, na plastificação de poli(cloreto de vinila), ácido polilactico e poli-3-hidroxibutirato.

O aumento da hidrofobicidade na matriz filmogênica pode acarretar em decréscimo dos valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA). Muitos estudos revelaram a importância do uso de lipídios na composição dos filmes quanto à proteção à transferência ao vapor de água, quando esses são feitos pela técnica de *casting* (Pommet et al., 2003a; Bravin et al., 2004; Bertan et al., 2005; Wang et al., 2009; Chen et al., 2009 e 2010). De acordo com McHugh e Krochta (1994) a diminuição da PVA pela incorporação de lipídios na formulação filmogênica deve-se ao fato de que as proteínas estariam parcialmente imobilizadas na interface da matriz pelas partículas lipídicas emulsionadas, diminuindo a mobilidade polimérica e reduzindo a difusividade da água através da proteína interfacial. Filmes a base de amido de tapioca e goma da folha “hsian-tsao” foram preparados pelas técnicas de emulsão e laminação, respectivamente, por Chen et al. (2009) e Chen et al. (2010). Eles observaram que a PVA foi reduzida significativamente pela adição de surfactantes, obtendo valores muito inferiores aos normalmente reportados na literatura.

Zahedi et al. (2010) na elaboração de filmes protéicos a base da globulina de pistache e surfactante Tween 80, reduziram em aproximadamente 37% a 43% a PVA a partir da adição de ácidos graxos palmítico e esteárico. No entanto a adição desses compostos lipídicos à formulação filmogênica resultou em filmes fracos, onde a tensão na ruptura não ultrapassou 10 MPa. Os filmes emulsionados também perderam em flexibilidade com relação ao filme controle (sem a adição dos ácidos graxos), o

alongamento passou de aproximadamente 100% (filme controle) para a média de 50% devido a adição dos lipídios, possivelmente porque filmes emulsionados possuem baixo conteúdo de água, contribuindo para a diminuição da mobilidade entre as cadeias protéicas (Quezada-Gallo et al., 2000). De acordo com os autores, a incorporação dos ácidos graxos criou uma matriz filmogênica heterogênea provavelmente devido ao enfraquecimento das interações intermoleculares com conseqüente redução nos valores de tensão na ruptura dos filmes emulsionados.

Em filmes e coberturas, a cor e opacidade, podem ser fatores importantes que influenciam no potencial de emprego desse tipo de material, principalmente se o objetivo for a sua utilização em aplicações diretas sobre os alimentos ou mesmo usados como embalagens, nesses casos uma maior transparência pode ser desejável (Yang e Paulson, 2000; Gontard et al., 1994). Outro aspecto importante é que os filmes não devem apresentar alterações de coloração e de opacidade durante o tempo de armazenamento, pois tais alterações podem prejudicar a aceitação do produto acondicionado (Chen, 1995). A adição de compostos hidrofóbicos à formulação filmogênica geralmente acarreta em filmes menos transparentes, ou seja, mais opacos, conforme foi observado por Quezada-Gallo et al. (2000) em filmes emulsionados de metilcelulose que resultaram em transparência significativamente menor do que os filmes que foram adicionados de lipídios. Yang e Paulson (2000) também observaram aumento na opacidade de filmes de gelatina de acordo com o aumento nas concentrações de ácidos esteárico e palmítico. A adição crescente de triacetina, ácidos graxos e breu branco em filmes a base de gelatina resultou no aumento nos valores de opacidade (Bertan et al., 2005).

Na análise da temperatura de transição vítrea (T_g) em filmes a base de globulina de pistache e ácidos graxos (Zahedi et al., 2010), foi observado somente a presença de um pico

de transição vítrea, indicando, segundo esses autores, a compatibilidade e uma boa dispersão dos compostos hidrofóbicos com o biopolímero. Todas as substâncias utilizadas para a formação do filme contribuíram para a estruturação da matriz filmogênica. Enquanto que Pommet et al. (2003a) observaram a presença de duas Tg em filmes a base de glúten de trigo quando ácidos láurico, mirístico e palmítico foram adicionados à solução formadora de filme. A presença de mais de uma Tg deveu-se à distribuição heterogênea desses ácidos graxos na matriz polimérica induzindo regiões nas quais o lipídeo pode ter permanecido numa fase relativamente cristalina (Pommet et al., 2003a).

Algumas propriedades funcionais como tensão na ruptura, alongamento e permeabilidade ao vapor de água de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis reportados na literatura são comparados com alguns filmes plásticos convencionais e podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água de filmes biodegradáveis e convencionais.

<i>Filme</i>	<i>Tipo de filme</i>	<i>Espessura</i> (μm)	<i>TR</i> (MPa)	<i>A'</i> (%)	<i>PVA'</i> ($\text{g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)	<i>Referência</i>
Gelatina e óleo de milho	Emulsionado	42-66	6-15,5	100-350	2-3	Wang et al. (2009)
Amido de milho, MC ² , óleo de soja, manteiga cacau, surfactantes (GMS ³ , Tweens 60 e 80)	Emulsionado	-	7-21	4-30	0,40-0,80	Bravin et al. (2004)
Amido de tapioca, goma da folha de hsian-tsao e ésteres de sucrose	Emulsionado	56-77	20-50	1,5-3,0	0,036-0,45	Chen et al. (2009)
Caseinato de sódio e misturas de ácido oléico e cera de abelha	Emulsionado	-	1-6	3-36	2-4	Fabra et al. (2008)
Amido de batata e surfactantes (Tween 20, Span 80 e lecitina)	Emulsionado	45-90	2-45	3-37	1-2,5	Rodríguez et al. (2006)
Isolado protéico de soro de leite e cera de abelha	Emulsionado	-	2-12	1-5	0,5 – 3,0	Pérez-Gago e Krochta (2001)
MC ² , PEG 400 ⁴ , óleo e cera de parafina	Emulsionado Bicamada	50-140	-	-	0,0072-0,0014	Martín-Polo et al. (1992)

Continuação Tabela 5

<i>Filme</i>	<i>Tipo de filme</i>	<i>Espessura (μm)</i>	<i>TR¹ (MPa)</i>	<i>A¹ (%)</i>	<i>PVA¹ ($\text{g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)</i>	<i>Referência</i>
Amido de tapioca, goma da folha de hsian-tsau e ésteres de sucrose	Bicamada	60-90	20-50	2,0-3,5	0,0051-0,47	Chen et al. (2010)
Agar, amido de mandioca, óleo vegetal hidrogenado, éster de sacarose	Emulsionado	40-65	5-42	0,90-30	0,07-0,50	Phan The et al. (2009)
MC ² , PEG 400 ⁴ , óleo e cera de parafina, óleo palma hidrogenada,	Emulsionado	100-120	-	10-35	0,04-0,72	Quezada-Gallo et al. (2000)
Quitosana, glicerol, Tween 20	Emulsionado	30-50	40-80	20-70	0,8-1,4	Ziani et al. (2008)
Iota-carragena, glicerol, GBS ⁵ , GMS ³ , óleo vegetal	Emulsionado	-	-	-	0,54-0,72	Karbowiak et al. (2007)
hidrogenado, cera de abelha, SDS ⁶	-	-	175	70-100	0,0043-0,0054	Briston (1988)
Poliéster	-	-	165-170	50-75	0,0018	Briston (1988)
Polipropileno	-	-	8,6-17,3	500	0,0026-0,0035	Briston (1988)
Polietileno de baixa densidade	-	-				

Continuação Tabela 5

<i>Filme</i>	<i>Tipo de filme</i>	<i>Espessura</i> (μm)	<i>TR¹</i> (MPa)	<i>A¹</i> (%)	<i>PVA¹</i> ($\text{g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)	<i>Referência</i>
Polietileno de alta densidade	-	-	17,3-34,6	300	0,00086	Briston (1988)
Poli (cloreto de vinilideno) rígido	-	-	45-55,3	120	0,0052-0,0069	Briston (1988)
Poli (cloreto de vinilideno) plastificado	-	-	27,6-34,5	14-200	0,0026-0,0069	Briston (1988)

¹ TR: Tensão na ruptura, A: Alongamento, PVA: Permeabilidade ao vapor de água. ² MC: Metilcelulose, ³ GMS: glicerol monoestereato, ⁴ PEG: Polietileno glicol, ⁵ GBS: Grindsted Barrier System 2000 (éster de ácido acético de mono e diglicerídeos), ⁶ SDS: sódio dodecil sulfato.

2.5.2. Filmes feitos por extrusão

Diferente dos polissacarídeos, que possuem um único grupo reativo é a hidroxila, as proteínas oferecem uma grande possibilidade de interações e reações químicas (Kokini et al., 1994). As proteínas podem participar nas reações químicas através de ligações covalentes (peptídicas e dissulfídicas) e interações não covalentes, por meio de ligações iônicas, van der Waals e ligações de hidrogênio, também há a possibilidade de formação de interações hidrofóbicas que ocorrem entre os grupos apolares de alguns aminoácidos (Kokini et al., 1994). As proteínas também são sensíveis a mudanças na temperatura, onde dependendo da temperatura utilizada, pode ocorrer a degradação da proteína. São ainda sensíveis ao teor de umidade, o qual pode atuar como plastificante. Altas temperaturas e baixos teores de umidade podem resultar em degradação protéica durante o processamento termoplástico (Hernández-Izquierdo e Krochta, 2008).

Altas temperaturas promovem a associação das cadeias poliméricas através de interações hidrofóbicas e estabilização por meio de ligações dissulfídicas (Redl et al., 1999). A formação densa dessas associações e ligações cruzadas dentro no canhão extrusor causam aumento na viscosidade e diminuição da mobilidade da cadeia, como resultado, o tempo de residência, o torque e a pressão na zona de cisalhamento irão aumentar podendo acarretar na degradação da proteína. Plastificantes e outros aditivos químicos podem ser empregados com o intuito de se reduzir essas interações intermoleculares durante a extrusão, permitindo trabalhar em condições mais adequadas de processo e alcançar melhores propriedades finais do produto formado (Verbeek e van den Berg, 2010). O processamento de proteínas pela extrusão pode acarretar em materiais com razoáveis propriedades mecânicas, quando comparados aos plásticos sintéticos. Os filmes protéicos

extrusados possuem similares tensões na ruptura, mas geralmente são menos flexíveis que os sintéticos (Verbeek e van den Berg, 2010). De acordo com esses autores a solubilidade de filmes protéicos antes e após o processamento é geralmente tida como um bom indicador de formação de ligações cruzadas durante o processamento, podendo indicar o tipo de interações formadas durante a extrusão.

A tecnologia de extrusão foi investigada na produção de filmes a base de zeína e ácidos graxos por Ha e Padua (2001). Os autores observaram que o aumento da temperatura de processamento causou o aumento da tensão na ruptura e diminuição nos valores de alongamento. Enquanto que a adição de solvente diminuiu a viscosidade e promoveu melhor processabilidade do material durante a extrusão. Esses autores também observaram que a velocidade da rosca não interferiu significativamente nas propriedades avaliadas.

Park et al. (2008) elaboraram filmes a base de gelatina, sorbitol e glicerol, por *casting* e por extrusão e compararam os filmes resultantes obtidos pelos dois métodos. Previamente à extrusão, foi preparada uma resina e as condições de ajuste da umidade de pré-acondicionamento dessa resina foram fatores importantes para a aplicação posterior nas condições de extrusão. Esses autores observaram que a mistura de gelatina e sorbitol formaram filmes mais espessos devido à baixa capacidade de fluidez proporcionada por essa mistura na extrusora. Quando Park et al. (2008) compararam as propriedades mecânicas dos filmes elaborados por *casting* e por extrusão, observaram que a tensão na ruptura foi superior para filmes por *casting*, porém o alongamento maior foi apresentado para filmes extrusados. Normalmente os biopolímeros extrusados apresentam micro canais (*micro voids*) devido a evaporação excessiva da água. Wang e Padua. (2003) também observaram a presença dos microcanais em filmes extrusados a base de zeína. Esses autores produziram também filmes por extrusão seguida de sopro e identificaram que a técnica de

produção dos filmes a base de zeína teve influência sobre suas propriedades mecânicas e que a taxa de evaporação de umidade foi o fator de maior importância para essa diferença.

O aumento na concentração de glicerol de 20 a 40% provocou o aumento significativo nos valores de alongamento de 1,5 a 106% em filmes de proteína do soro de leite feitos por compressão, no entanto, a tensão na ruptura diminuiu de 15,8 para 1,6 MPa (Cunningham et al., 2000). Sothornvit et al. (2007), em filmes feitos moldados por compressão a base de proteína do soro de leite e Zhang et al. (2001) em filmes extrusados de proteína isolada de soja, também observaram o mesmo comportamento de acordo com o aumento na concentração de glicerol. Observou-se que quantidades muito baixas de glicerol resultaram em filmes extremamente frágeis e quebradiços, com dificuldades de processamento do material (Zhang et al., 2001).

O processamento de filmes a base de pectina e gelatina adicionados de alginato de sódio, com a presença de óleos de milho e de oliva formaram matrizes estáveis, mesmo após refrigeração do material, e, portanto foram considerados com grande potencial para serem utilizadas como embalagens (Liu et al., 2006). Esses autores observaram que as temperaturas utilizadas normalmente em processos de elaboração de filmes via *casting* são baixas (ao redor de 80 °C) quando comparadas às temperaturas usadas na extrusão (máxima de 135 °C). Os autores observaram também que a diferença na temperatura e pressão utilizadas entre os dois processos afetou a inclusão do óleo utilizado, modificando a PVA, observando, entretanto, que a quantidade adicionada dos óleos que não excedeu a 5%, não foi suficiente para otimizar as propriedades de barreira ao vapor de água.

Na comparação de filmes de zeína processados por extrusor de rosca simples e rosca dupla, Wang e Padua (2003) demonstraram que a tensão de ruptura em filmes plastificados com ácido oléico foi maior para aqueles elaborados no extrusor de rosca dupla, enquanto

que os valores de alongamento foram superiores para os filmes obtidos pelo extrusor de rosca simples. Os autores atribuíram essa diferença nas propriedades mecânicas devido a alta pressão e força de atrito superior desenvolvidos no extrusor de rosca dupla.

Na Tabela 6 observam-se as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água bem como valores de solubilidade para filmes protéicos elaborados por extrusão ou pelo método da moldagem por compressão. De maneira geral, os filmes protéicos são mais fracos e possuem menor alongamento quando comparados aos filmes sintéticos e, por isso, podem ser utilizados como envoltórios individuais ou como pequenas bolsas protegidas por uma embalagem secundária como, por exemplo, caixas de papelão (Hernández-Izquierdo e Krochta, 2008).

A técnica de moldagem por compressão foi avaliada na formação de materiais termoplásticos a base de proteína do soro de leite por Sothornvit et al. (2003). Esses autores reportaram que a plastificação da proteína com água resultou em filmes frágeis, porém insolúveis em água, enquanto que a adição de glicerol tornou o material mais flexível. A solubilidade do filme dependeu da temperatura utilizada para a formação do mesmo. Esses autores observaram que a PVA não foi afetada pela quantidade de plastificante, nem pela temperatura e pressão da compressão, com valores de PVA observados variando de 14 a $16 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$.

Tabela 6. Propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água e solubilidade de filmes protéicos processados por extrusão ou moldagem por compressão.

<i>Método de formação</i>	<i>Filme</i>	<i>Espessura</i> (μm)	<i>TR¹</i> (MPa)	<i>A¹</i> (%)	<i>PVA¹</i> ($\text{g mm m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{kPa}^{-1}$)	<i>SOL¹</i> (%)	<i>Referência</i>
Moldagem por compressão	Proteína do soro de leite e glicerol	600-800	-	-	14-16	30-50	Sothornvit et al. (2003)
Moldagem por compressão	Proteína do soro de leite e glicerol	570-1320	4-10	40-95	-	-	Sothornvit et al. (2007)
Extrusão	Gelatina, glicerol e sorbitol	270-1060	17-21	160-216	5-10	-	Park et al. (2008)
Prensagem a quente		217-590					
Extrusão (rosca dupla)	Proteína do soro de leite e glicerol	1310	3-4	30-50	-	-	Hernández-Izquierdo et al. (2008)
Extrusão (rosca simples)	Zeína e ácido oléico	-	~3	96-120	-	-	Wang e Padua (2003)
Extrusão (rosca dupla)	Zeína e ácido oléico	-	4-7	50-100	-	-	Wang e Padua (2003)
Extrusão seguida por sopro	Zeína e ácido oléico	-	~3	79-92	-	-	Wang e Padua (2003)
Extrusão (rosca dupla)	Zeína e ácido oléico	-	-	-	0,08-0,15	-	Wang e Padua (2004)
Extrusão (rosca dupla)	Zeína e mistura de ácidos graxos	-	7	~25	-	-	Ha e Padua (2001)

Continuação Tabela 6

<i>Método de formação</i>	<i>Filme</i>	<i>Espessura</i> (μm)	<i>TR</i> ¹ (MPa)	<i>A</i> ¹ (%)	<i>PVA</i> ¹ ($\text{g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)	<i>SOL</i> ¹ (%)	<i>Referência</i>
Extrusão (rosca dupla)	Proteína isolada da soja e glicerol	-	~ 7	-	-	-	Zhang et al. (2001)
Moldagem por compressão	Proteína isolada da soja e glicerol	160-350	1-16	1-106	-	-	Cunningham et al. (2000)

Nota: ¹ TR = tensão na ruptura, A = alongamento, PVA = permeabilidade ao vapor de água, SOL = solubilidade.

2.6. Referências Bibliográficas

- Achet, D., & He, X. W. (1995). Determination of the renaturation level in gelatins films. *Polymer*, 36, 787-791.
- Arvanitoyannis, I. (2002). Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In Gennadios, A. (Ed.). *Protein-based films and coatings*, pp. 275-304. New York: CRC Press, Boca Raton.
- Banker, G. S. (1966). Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science*, 55, 81-89.
- Benning, C. J. (1983). *Plastic Films for Packaging, Technology, Applications and Process Economics*. Technomic Publishing Company, Inc.
- Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19, 73-82.
- Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawat, P., & Sanguandeeikul, R. (2005). Effect of select parameters on the properties of edible films from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *Food Science and Technology*, 39, 406-419.
- Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2004). Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6448-6455.
- Briston, J. H. (1988). *Plastic Films*. 3º edição, Wiley, New York, USA.
- Callegarin, F. Quezada-Gallo, J., Debeaufort, F., & Voilley, A. (1997). Lipids and biopackaging. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74, 1183-1192.
- Cantor, K. (2001). *Plástico Moderno*, 4883.
- Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2004). Characterization of gelatin based films

- modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18, 717-726.
- Cheeke, P. R. (2000). Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Journal of Animal Science*, 77, 1-10.
- Cheftel, J. C. (1986). Nutritional effects of extrusion-cooking. *Food Chemistry*, 20, 263-283.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1989). *Proteínas Alimentarias*. Ed. Acribia.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 78, 2563-2583.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.S. (2010). Water barrier and physical properties of starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films: impact of surfactant lamination. *Food Hydrocolloids*, 24, 200-207.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.-S. (2009). Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in. *Food Hydrocolloids*, 23, 714-721.
- Cho, S. Y., & Rhee, C. (2002). Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *Food Science and Technology*, 35, 151-157.
- Coupland, J. N., Shaw, N. B., Monahan, F. J., O'riordan, E. D., & O'sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein films. *Journal of Food Engineers*, 43, 25-30.
- Cunningham, P., Ogale, A. A., Dawson, P. L., & Acton, J. C. (2000). Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science*, 65, 668-671.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1996). Rheological model for the

mechanical properties of myofibrillar protein-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1116-1122.

Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1997a). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as effect by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 662-626.

Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1997b). Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affect by moisture content. *Polymer*, 38, 2399-2405.

Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75, 1-9.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Delport, B., & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180, 47-55.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science*, 38, 299-313.

Debeaufort, F., Martín-Polo, M., & Voilley, A. (1993). Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible film. *Journal of Food Science*, 58, 426-429.

di Gioia, L., & Guilbert, S. (1999). Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1254-1261.

Djagny, K. B., Wang, Z., & Xu, S. (2001). Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41, 481-492.

Domenek, S., Feuilloley, P., Gratraud, J., Morel, M.-H., Guilbert, S. (2004).

Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. *Chemosphere*, 54, 551-559.

Domingo, B. J., & Morris, S. A. (1999). Mechanical performance studies on extruded cornstarch-based plastic manufactures. *Journal of Applied Polymer Science*, 71, 2147-2154.

Donhowe, I. G., & Fennema, O. (1994). Edible films and coating: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, M. O. (Ed.). *Edible coatings and films to improve food quality*, pp. 1-24. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc.

Dorsa, R. T. *Tecnologia de óleos vegetais*. Campinas: Ideal, 2004, 436p.

Entwistle, C. A., & Rowe, R. C. (1978). Plasticization of cellulose ethers used in the film coating tablets. *Journal Pharm. Pharmacology*, 31, 269-272.

Erickson, M. C. (1998). Chemistry and function of phospholipids. In: Akok, C. C., & Min, D. B. (Eds.). *Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, pp. 37-53. New York: Marcel Dekker, Inc.

Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.

Fakhouri, F. M. (2008). *Bioplásticos comestíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 207p.

Felton, L. A., Haase, M. M., Shah, N. H., Zhang, G., Infeld, M. H., Malick, A. W., & McGinity, J. W. (1995). Physical and enteric properties of soft gelatin capsules coated with Eudragit® L 30 D-55. *International Journal of Pharmaceutics*, 113, 17-24.

Finkenstadt, V. L., Mohamed, A. A., Biresaw, G., & Willett, J. L. (2008). Mechanical properties of green composites with polycaprolactone and wheat gluten. *Journal of Applied*

Polymer Science, 110, 2218-2226.

Fishman, M. L., Coffin, D. R., Konstance, R. P., & Onwulata, C. I. (2000). Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydrate Polymers*, 41, 317-325.

Frohoff-Hülsmann, M. A., Lippold, C. B., & McGinity, J. M. (1999). Aqueous ethyl cellulose dispersion containing plasticizers of different water solubility and hydroxypropyl methyl-cellulose as coating material for diffusion pellets II: properties of sprayed films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48, 67-75.

Galietta, G., di Gioia, L., Guilbert, S., & Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, 81, 3123-3130.

Garcia, F. T., & Sobral, P. J. A. (2005). Effect of the treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of tilapia. *Food Science and Technology*, 38, 289-296.

Gennadios, A., Mchugh, T. H., Weller, C. L., & Krochta, J. M. (1994). Edible coating and films based on proteins. In: Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, M. O. (Eds.). *Edible coatings and to improve food quality*, pp. 210-278. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc.

Ghorpade, V. M., & Hanna, M. A. (1996). Mechanical properties of soy-protein-polyethylene ribbon and film extrudates. *Transactions of the American Society of the Chemical Engineers*, 39, 611-615.

Gil, N., Saska, M., & Negulescu, I. (2006). Evaluation of the effects of biobased plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly (vinyl chloride). *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 1366-1373.

Gontard, N., & Guilbert, S. (1994). Bio-packaging; technology and properties of edible

- and/or biodegradable material of agricultural origin. In Mathlouthi, M. (Ed.). *Food Packaging and Preservation*, pp. 159-181. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Gontard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J.-L. (1993). Water and glycerol as plasticizers effect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 206-211.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39-50.
- Gontard, N., Marchesseau, S., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1995). Water vapour permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 49-56.
- Guéguen, J., Viroben, J., Barbot, J., & Subirade, M. (1998). Comparative properties of pea protein and wheat gluten films. Influence of various plasticizers and aging. In: Guéguen, J., & Popineau, Y. (Ed.). *Plant proteins from European crops, food and non-food applications*, pp. 319-323. Berlin: Springer-Verlag.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. In Mathlouthi, M. (Ed.). *Food Packaging and Preservation*, pp. 371-374. Elsevier Applied Science Publishers: New York.
- Güçlü-Üstündag, O., & Mazza, G. (2007). Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231-258.
- Ha, T. T., & Padua, G. W. (2001). Effect of extrusion processing on properties of zein-fatty acids sheets. *Transactions of the ASAE*, 44, 1223-1228.
- Heldman, D. R., & Singh, R. P. (1981). *Food Process Engineering*. Second Edition. New York: AVI Publishing Co, Van Nostrand Reinhold.

- Heng, P. W. S., Chan, L. W., & Ong, K. T. (2003). Influence of storage conditions and type of plasticizers and type on ethylcellulose and acylate films formed from aqueous dispersions. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 334-344.
- Herald, T. J., Obuz, E., Twombly, W. W., & Rausch, K. D. (2002). Tensile properties of extruded corn protein low-density polyethylene films. *Cereal Chemistry*, 79, 261-264.
- Hernández-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation – a review. *Journal of Food Science*, 73, R30-R39.
- Hernández-Izquierdo, V. M., Reid, D. S., Mchugh, T. H., Berrios, J. J., & Krochta, J. M. (2008). Thermal transition and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. *Food Engineering and Physical Properties*, 73, 169-175.
- Iwata, K., Ishizaki, S., Handa, A., & Tanaka, M. (2000). Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. *Fisheries Science*, 66, 372-378.
- Jangchud, A., & Chinnan, M. S. (1999). Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *Food Science and Technology*, 32, 89-94.
- Johnston-Banks, F. A. (1990). Gelatin. In Harris, P. (Ed.). *Food Gels*, pp. 233-289. London: Elsevier Applied Food Science Series.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222, 229-235.
- Kamper, S. L., & Fennema, O. R. (1984). Water vapor permeability of edible bilayer films. *Journal of Food Science*, 49, 1478-1481.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2007). Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 21, 879-888.

- Kester, J. J., & Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, 47-59.
- Kokini, J. L., Cocero, A. M., Madeka, H., & Graaf, E. (1994). The development of state diagrams for cereal proteins. *Trends of Food Science and Technology*, 5, 281-288.
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Zampraka, A. (2007). Water vapor barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101, 753-764.
- Krochta, J. M., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriero, M. (Ed.). (1994). *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 379p.
- Krochta, J. M., & Mulder-Jonhston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 60-74.
- Labrecque, L. V., Kumar, R. A., Davé, V., Gross, R. A., & McCarthy, S. P. (1997). Citrate esters as plasticizer for poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 66, 1507-1513.
- Labuza, T. P. (1982). Moisture gain and loss in packaged foods. *Food Technology*, 36, 92-97.
- Leuenberger, B. H. (1991). Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloids*, 5, 353-361.
- Lim, L.-T., Auras, R., & Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, 33, 820-852.
- Liu, L., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2005). Selection of optimum extrusion technology parameters in the manufacture of edible/biodegradable packaging films derived from food-based polymers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3, 51-58.
- Liu, L., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2006). Effect of food ingredients and selected lipids on

the physical properties of extruded edible films/casings. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 295-302.

Longares, A., Monahan, F. J., O'riordan, E. D., & O'sullivan, M. (2005). Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. *International Dairy Journal*, 15, 1255-1260.

Manrich, S. (2005). *Processamento de termoplásticos*. São Paulo: Artliber Editora, 431p.

Mariani, P. D. S. C., Allganer, K., Oliveira, F. B., Cardoso, E. J. B. N., & Innocentini-Mei, L. H. (2009). Effect of soy protein isolate on the thermal, mechanical and morphological properties of poly (ϵ -caprolactone) and corn starch blends. *Polymer Testing*, 28, 824-829.

Marquié, C., Aymard, C., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1995). Biodegradable packaging made from cottonseed flour: formation and improvement by chemical treatment with gossypol, formaldehyde and glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2762-2766.

Martín-Polo, M., Mauguin, C., & Voilley, A. (1992). Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. I. Influence of the film preparation technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 407-412.

McClements, D. J. (1998). Lipid-based emulsions and emulsifiers. In: Akok, C. C., & Min, D. B. (Eds.). *Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, pp. 55-88. New York: Marcel Dekker, Inc.

McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 71, 307-312.

Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Food Science and Technology*, 8, 228-237.

- Menegalli, F. C., Sobral, P. J. A., Roques, M. A., & Laurent, S. (1999). Characteristics of gelatin biofilms in relation to drying process conditions near melting. *Drying Technology Journal*, 17, 1697-1706.
- Monterrey-Quintero, E. S., & Sobral, P. J. A. (1999). Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo usando uma metodologia de superfície de resposta. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 294-301.
- Monterrey-Quintero, E. S., & Sobral, P. J. A. (2000). Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 179-189.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67-89.
- Naga, M., Kirihara, S., Tokugawa, Y., Tsuda, F., & Hirotsuka, M. (1996). *Process for producing edible proteinaceous film*. US Patent 5569482.
- O'Brien, R. D. (1998). *Fats and oils: formulating and processing for applications*. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc., 667p.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., & Cheeke, P. (2001a). Steroidal saponins of *Yucca schidigera* Roezl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4392-4396.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., & Cheeke, P. (2001b). Reversatrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roezl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 747-752.
- Olkku, J., & Linko, P. (1977). Effects of thermal processing on cereal-based food systems.

- In Dawney, W. K. (Ed.). *Food Quality and Nutrition. Research priorities for thermal processing*, London: Applied Science Publishers.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., & Rigal, L. (2003). Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18, 91-100.
- Pagga, U. (1998). Biodegradability and compostability of polymeric materials in the context of the European packaging regulation. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 371-376.
- Paschoalick, T. M., Garcia, F. T., Sobral, P. J. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2003). Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloids*, 17, 419-427.
- Park, J. W., Whiteside, W. S., & Cho, S. Y. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *Food Science and Technology*, 41, 692-700.
- Pérez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 996-1002.
- Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A., & Luu, D. (2009). Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films. *Food Hydrocolloids*, 23, 691-699.
- Piacente, S., Montoro, P., Oleszek, W., & Pizza, C. (2004). *Yucca schidigera* bark: phenolic constituents and antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, 67, 882-885.
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., & Guilbert, S. (2003a). Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44, 115-122.

- Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., Domenek, S., & Guilbert, S. (2003b). Thermoplastic processing of protein-based bioplastics: chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding. *Macromolecular Symposia*, 197, 207-217.
- Poppe, J. (1997). Gelatin. In: Imeson, A. (Ed.). *Thickening and gelling agents for food*, pp. 1474-179. 2° ed. London: Blackie Academic and Professional.
- Porter, M. R. (1991). *Handbook of surfactants*. New York: Chapman & Hall, 227p.
- Pushpadass, H. A., Marx, D. B., Wehling, R. L., & Hanna, M. A. (2009). Extrusion and characterization of starch films. *Cereal Chemistry*, 86, 44-51.
- Quezada-Gallo, J. A., Debeaufort, F., Callegarin, F., & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science*, 180, 37-46.
- Rahman, M., & Brazel, C. S. (2004). The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science*, 29, 1223-1248.
- Redl, A., Morel, M. H., Bonicel, J., Vergnes, B., & Guilbert, S. (1999). Extrusion of wheat gluten plasticized with glycerol: influence of process conditions on flow behavior, rheological properties, and molecular size distribution. *Cereal Chemistry*, 76, 361-370.
- Riaz, M. N. (2000). Introduction to extruders and their principles. In Riaz, M. N. (Ed.). *Extruders in food applications* (pp. 1-23), 1, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39, 840-846.
- Rosato, D. V., & Rosato, D. V. (1988). *Blown molding handbook*, pp.614-618. Hanser Publishers.

- Rosen, M. J. (1989). *Surfactants and interfacial phenomena*. New York: Wiley, 431p.
- Sakanaka, L. S. (2007). *Filmes biodegradáveis de blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA)*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 109p.
- Schenkel, E. P., Gosmann, G., & Athayde, M. L. (2007). Saponinas. In Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, pp. 711-740, 6, Porto Alegre: UFRGS Editora.
- Schneider, M. (1997). Phospholipids. In Gunstone, F. D., & Padley, F. B. *Lipid Technologies and Applications*, pp. 51-78. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Siepmann, J., Paeratakul, O., & Bodmeier, R. (1998). Modeling plasticizer uptake in aqueous polymer dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 165, 191-200.
- Smith, O. B. (1969). Extrusion-processed cereal foods. In *Protein-Enriched Cereal Foods for World Needs*, St Louis, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinguer, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15, 423-432.
- Sobral, P. J. A., Monterrey-Quintero, E. S., & Habitante, A. M. Q. B. (2002). Glass transition of Nile tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67, 499-504.
- Sobral, P. J. A., Santos, J. S., & Garcia, F. T. (2005). Effect of protein and plasticizer concentrations in films forming solutions on physical properties of edible and films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. *Journal of Food Engineering*, 70, 93-100.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.

Sothornvit, R., Olsen, C. W., Mchugh, T. H., & Krochta, J. M. (2003). Formation conditions, water-vapor permeability, and solubility of compression-molded whey protein films. *Journal of Food Science*, 68, 1985-1989.

Sothornvit, R., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (2007). Tensile properties of compression-molded whey protein sheets: determination of molding condition and glycerol-content effects and comparison with solution-cast films. *Journal of Food Engineering*, 78, 855-860.

Stevens, M. P. (1999). *Polymer chemistry. An introduction*. New York: Oxford University Press. 551p.

Sztuka, K., & Kołodziejska, I. (2009). The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). *Food Hydrocolloids*, 23, 1062-1064.

Tanaka, M., Iwata, K., Sanguandeeikul, R., Handa, A., & Ishizaki, S. (2001). Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. *Fisheries Science*, 67, 346-351.

Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in food Science & Technology*, 14, 71-78.

Thomazine, M., Carvalho, R. A., & Sobral, P. J. A. (2005). Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. *Journal of Food Science*, 70, 172-176.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. (2003). Code of Federal Regulations Title 21, Volume 3 Title 21-Food and Drugs Chapter I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services Part 172-Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption. <http://www.cfsan.fda.gov/1rd/FCF172.html>, acesso em 15/07/2009.

- van Soest, J. J. G., & Knooren, N. (1997). Influence of glycerol and water content on the structure and properties of extruded starch plastic sheets during aging. *Journal of Applied Polymer Science*, 64, 1411-1422.
- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). Effect of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin based films. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-907.
- Veis, A. (1994). *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*. New York: Academic Press, Inc.
- Verbeek, C. J. R., & van den Berg, L. E. (2010). Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 10-21.
- Vignol, L. A. (2005). *Desenvolvimento de modelos simplificados para o estudo da extrusão de polímeros*. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 152p.
- Vertellus. Vertellus Performance Materials Inc. *Product Family Citroflex® Citric Acid Esters*, (Geensboro, NC). atualizado em setembro de 2007. Disponível em www.vertellus.com/Market.aspx?MarketID=1&ProductFamilyID=17, acesso em 02/03/2010.
- Villalobos, R., Hernández, P., & Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-209.
- Wang, C. C., Zhang, G., Shah, N. H., Infeld, M. H., Malick, A. W., & McGinity, J. W. (1997). Influence of plasticizer on the mechanical properties of pellets containing Eudragit® RS 30 D. *International Journal of Pharmaceutics*, 152, 153-163.
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2004). Water sorption properties of extruded zein films.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2, 3100-3105.

Wang, Y., & Padua, G. W. (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288, 886-893.

Wang, L., Zhu, W., Wang, X., Chen, X., Chen, G.-H., & Xu, K. (2008). Processability modifications of poly(3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending and stabilizing. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 166-173.

Wang, L., Auty, M. A. E., Rau, A., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2009). Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of Food Engineering*, 90, 11-19.

Wina, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2005). The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8093-8105.

Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33, 571-578.

Yoshida, C. M. P., & Antunes, A. J. (2004). Characterization of whey protein emulsion films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2, 247-252.

Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., & Sedaghat, N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering* (in press).

Zhang, J., Mungara, P., & Jane, J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*, 42, 2569-2578.

Ziani, K., Osés, J., Coma, V., & Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Food Science and Technology*, 41, 2159-2165.

CAPÍTULO 3

“Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films”

Food Research International, v.42, p.1113-1121, 2009

Effects of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films

C. Andreuccetti ^a, R.A. de Carvalho^b, C.R.F. Grosso^{a*}

^a*Department of Foods and Nutrition, Faculty of Food Engineering, P.O. Box 6121, University of Campinas, UNICAMP, 13083-862 Campinas, SP, Brazil.*

^b*Food Engineering Department, ZEA-FZEA, P.O. Box 23, University of São Paulo, USP, 13635-900 Pirassununga, SP, Brazil.*

ABSTRACT

The aim of this study was the production and characterization of gelatin-based films using hydrophobic plasticizers derived from citric acid and soy lecithin as emulsifier. The films were characterized as to their mechanic properties, permeability to water vapor, opacity, morphology and possible interactions using Fourier transform infrared spectroscopy. Tensile strength values (TS) varied from 36 to 103 MPa, however, the increase in the concentration of plasticizers (acetyltributyl citrate and tributyl citrate) reduced TS by 57% and no relation was observed between plasticizer quantities and the elongation in the quantities tested. Permeability to water vapor varied between 0.17 a 0.34 (g mm/m² h kPa), slightly increasing with the increase in concentration of plasticizers. The effectiveness in the use of soy lecithin emulsifier in the homogenization between the compounds could be proven by microscopic observation using confocal laser microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +55-19-35214079; fax: +55-19-35214060
E-mail address: grosso@fea.unicamp.br (C.R.F. Grosso)

Keywords: Edible film; Gelatin, Hydrophobic plasticizer; Lecithin; Acetyltributyl citrate, Tributyl citrate.

1. Introduction

Protein films have good mechanical resistance but present high permeability to water vapor. They are very sensitive to environmental conditions, notably to relative humidity (RH), due to the hygroscopic character of this material. Independently of the protein used, the production of edible and/or biodegradable film requires the use of a plasticizer in order to increase its flexibility and its handling and it may simultaneously induce the reduction of the vitreous transition in an undesirable manner (Rahman & Brazel, 2004). In structural terms, the plasticizers are inserted into the polymeric matrix, increasing the free space between the chains, causing a decrease of intermolecular forces along the matrix (Rodríguez, Osés, Ziani & Maté, 2006; Sothornvit & Krochta, 2001). The most widely used plasticizers include glycerol (Chen & Lai, 2008; Sobral, Santos & Garcia, 2005); sorbitol (Thomazine, Carvalho & Sobral, 2005; Carvalho et al., 2008; Kristo & Biliaderis, 2006); propylene glycol and polyethylene glycol (Vanin, Sobral, Menegalli, Carvalho & Habitante, 2005). However, all these plasticizers present hydrophilic characters, which contribute to the increase of water permeability and susceptibility of the matrix to environmental humidity. The inclusion of hydrophobic components as an alternative to reduce this behavior is being studied. Films composed of lipid-polysaccharides (Callegarin, Gallo, Debeaufort & Voilley, 1997; Cheng, Abd Karin & Seow, 2008; Karbowski,

Debeaufort & Voilley, 2007) or of lipid-proteins (Bertan, Tanada-Palmu, Siani & Grosso, 2005; Gontard, Marchesseau, Cuq & Guilbert, 1995; MgHugh & Krochta, 1994a) in laminated or emulsion form, have been developed, presenting increase in resistance to humidity, but with loss in their mechanical properties.

Hydrophobic plasticizers are much used in the pharmaceutical industry for the production of biodegradable materials, but little used in filmogenic formulations. Among the hydrophobic plasticizers are citrate esters, derived from citric acid (Labrecque, Kumar, Davé, Gross & McCarthy, 1997), which do not present toxicity and are approved as additives in plastics for medical application, personal hygiene and contact with food, and present a rapid biodegradability (Rahman & Brazel, 2004).

Tributyl citrate, acetyltributyl citrate, triethyl citrate and acetyltriethyl citrate hydrophobic plasticizers were used in the production of films extruded through poly-vinyl alcohol resulting in the increase of flexibility of the films, reaching elongations above 600%, but the increasing addition of plasticizers caused a reduction reaching 80% of TS, reducing also the temperature of glass transition of the resulting films (Labrecque et al., 1997), similar to the behavior observed in edible and/or biodegradable films plasticized with polyols (Sobral, Menagalli, Hubinger & Roques, 2001; Sobral et al., 2005). When diethyl citrate, O-acetyltriethyl citrate and glycerol and maleic anhydride were used in the plasticizing of cellulose diacetate, it was observed that plasticized films with glycerol and maleic anhydride were more fragile in relation to those plasticized with citrate esters. The mechanical properties were superior for films plasticized with acetyltriethyl citrate, with TS between 28 and 40 MPa and elongation values reaching 70%. However, the citrate esters showed a reduction of 80-100 °C in the glass transition temperature of cellulose diacetate (Lee & Shiraishi, 2001).

Due to difficulties of homogeneous incorporation of hydrophobic composites in hydrophilic filmogenic matrices, the aim of this work was the development and the characterization of gelatin-based films using hydrophobic plasticizers derived from citric acid (tributyl citrate, acetyltributyl citrate, triethyl citrate, acetyltriethyl citrate) for the purpose of producing biodegradable films with better water-barrier properties. In addition, different concentrations of lecithin were added to the formulations studied. Mechanical properties, permeability to water vapor, morphology and possible interactions among the constituents used in the formulations were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pig type A hide gelatin (260 bloom) donated by Gelita do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brazil), tributyl citrate (TB, 360.4 Da), acetyltributyl citrate (ATB, 402.5 Da), triethyl citrate (TC, 276.3 Da), acetyltriethyl citrate (ATC, 318.3 Da) donated by Morflex, Inc. (Greensboro, North Caroline, USA) and soy lecithin (E 322, Caramuru, São Simão, GO, Brazil).

2.2. Preparation of biodegradable films

The films were prepared using casting techniques, with a fixed gelatin concentration of 4 g/100 g of film-forming solution. Tributyl citrate (TB), acetyltributyl

citrate (ATB), triethyl citrate (TC), acetyltriethyl citrate (ATC) plasticizers were added in concentrations (C_P) of 10, 30, 50 and 75 g/100 g of gelatin. Soy lecithin (C_L) was used as emulsifier agent in concentrations of 10, 30 and 60 g/100 g of plasticizer.

For the preparation of the film-forming solution (FFS), the gelatin was hydrated at room temperature (25 ± 2 °C) for 30 minutes, followed by solubilization at 55 °C for 15 minutes. The plasticizers and the lecithin were added in ethanol (20 g/100 g of filmogenic solution) and maintained under magnetic agitation for 2 h at room temperature. At the end of this period, the solubilized gelatin was added and the mixture was homogenized at 10,000 rpm for 10 min using homogenizer (UltraTurrax IKA, T18). The homogenized mixture was vacuum-filtered to reduce the air bubbles formed during agitation. The filmogenic solution obtained was dispersed on acrylic plates (20 x 12 cm) and kept at room temperature (25 ± 2 °C; $50 \pm 5\%$ RH) to dry for approximately 18 h.

Preliminary tests were performed for the suitability of film thickness from the filmogenic solutions containing different concentrations of plasticizers and soy lecithin. This verification was performed from the related volume of filmogenic solution by the supporting plate area in order to maintain constant the final thickness, among the different formulations studied. Films without the addition of soy lecithin were also prepared for later comparison.

Before characterization, and after drying, films were maintained in desiccators (25 ± 2 °C, $50 \pm 2\%$ RH, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$) during 7 days.

2.3. Film characterization, visual aspects and thickness

Visual and tactile analyses were carried out with the aim of using only homogeneous films without phase separation, exudation, absence of insoluble particles, uniform color, without brittle zones and easy to remove from acrylic supports. Films not presenting these characteristics were discarded. Film thickness was determined using a Mytutoyo Corp. digital micrometer (Tokyo, Japan) taking the average of 10 random measurements.

2.4. Mechanical properties

The tensile strength (TS), elastic modulus (EM) and elongation (E %) of the films (100 x 25 mm), as the average of 10 determinations, were determined using a model TA-XT2 texturometer, TA Instruments (Newcastle, USA) according to the ASTM D882-95 method (ASTM, 1995a). The initial distance of separation and velocity were adjusted to 50 mm and 1 mm/s respectively, with a 5 kg load cell.

2.5. Water vapor permeability

Water vapor permeability (WVP, g mm/m² h kPa) was determined at 25 ± 2 °C according to the ASTM E96-95 method (ASTM, 1995b). The inside of the cells were filled with anhydrous calcium chloride. The cells were covered with the conditioned films, sealed and placed in desiccators containing a saturated NaCl solution (75 ± 3% RH). Samples were weighed five times during 48 h and determinations were carried out in triplicate. Data were recorded in a weight gain vs. time graph. The coefficient of the straight line, obtained by linear regression, was determined and the WVP was calculated

by $WVP = g \ x / t \ A \ P_o \ (RH_1 - RH_2)$, where g/t is the coefficient of the straight line (g/h), x is the average thickness of the material (mm), A is the permeation area (m^2), P_o is the water vapor partial pressure at 25 °C (kPa) and $(RH_1 - RH_2)$ is the gradient of relative humidity of the environment containing anhydrous calcium chloride (0% RH) and saturated NaCl solution (75% RH).

2.6. Opacity

Film opacity was determined using a Hunterlab colorimeter (Colorquest II, Reston, VA, USA) according to the ASTM D523 method (ASTM, 1999), working with D₆₅ (day light) and a 30 mm opening measuring cell. The determinations were made in triplicate after calibration using black and white backgrounds, where $Opacity (O_p) = (O_{pb}/O_{pw}) * 100$, O_p being the percentage opacity of the films, O_{pb} is the opacity of the film against a black background and O_{pw} the opacity of the film against a white background.

2.7. Morphology

2.7.1. Scanning Electron Microscopy

Films were equilibrated in desiccators containing silica gel (25 °C) for a period of 7 days and then fractured with liquid nitrogen or left without fracture. The samples were coated with gold in a sputter coater POLARON SC7620 (Ringmer, England), 3-5 mA, during 180 s, morphological observations of the surface and internal structure of the films were done using a scanning electron microscope LEO 440i (Cambridge, England), at 5 kV.

2.7.2. Confocal Laser Scanning Microscopy

The morphology of films was also observed using a CARL-ZEISS LSM 510 META (Oberkochen, Germany) confocal laser scanning microscopy (CLSM). The laser was adjusted to the green/red fluorescence mode, which yielded two excitation wavelengths (488 and 514 nm). Green and red fluorescent images were obtained from these two separate channels and the images were then merged. For all observations the height was adjusted to be at half of the thickness of the films.

The dissolved gelatin was stained with fluorescein isothiocyanate, FITC (Lamprecht, Schaffer & Lehr, 2000), with modification in concentration, 50 μ l FITC/2.5 g of protein. After addition, the protein solution containing the dye was stirred for 1h at 40 °C before use. Plasticizer and lecithin were dyed with Nile Red (1 mg/30 g of hydrophobic substance) according to the same reference. The films with and without lecithin were produced as Section 2.2. After conditioning, small pieces of film were fixed to glass slides and observed by CLSM.

2.8. Infrared Spectroscopy

The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses were done according to Vicentini (2003) using a Perkin Elmer - Spectrum 2000 FT-IR (Massachusetts, USA) spectrometer with a Universal attenuated total reflectance (UATR) accessory at room temperature. Films were placed in the support and pressed by the measuring sensor. Ten scans were done for each sample, from a spectral range of 400-4000 cm^{-1} and a resolution of 4 cm^{-1} .

2.9. Experimental design and statistical analysis

The experimental design included four different plasticizers and each one was studied at four levels. At each level, three different concentrations of lecithin were used producing 12 formulations for each plasticizer and all formulations were produced three times. For opacity, mechanical and water vapor barrier properties, at least, three determinations were obtained for each film. Statistical analysis was carried out using Statistica 5.5 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) and the differences between the means were determined by the Tukey multiple test ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

Initially the films were prepared with ATB, TB, ATC and TC hydrophobic plasticizers without the addition of lecithin; although presenting flexibility, allowing its removal from the support, also presented separation from the phase with apparent exudation during the drying process of the filmogenic solution, being discarded for the continuity of the experiments.

Films with ATB, TB, ATC and TC and lecithin were prepared, and after drying it was observed that the films containing ATC and TC plasticizers presented reduced flexibility and exudation of these plasticizers on the surface of the films, so these films were discarded for the continuity of the experiments. The hypothesis presented in the literature for films where there is a separation of phases, is that the hydrophobic part of the solution is turned to the film/air interface, while the hydrophilic part bends to the surface

of the contact film support, thus producing exudation away from the film (Cuq, Gontard, Cuq & Guilbert, 1996).

The films produced with gelatin, ATB and TB and the lecithin emulsifier presented flexibility, were visually homogeneous and without apparent exudation, indicating that the lecithin was effective as an emulsifying agent, favoring the miscibility of these hydrophobic plasticizers (ATB and TB) in the protein matrix. Thus, only the plasticizers of the tributyl series (ATB and TB) were studied.

The thickness of the films varied from 0.035 ± 0.005 a 0.045 ± 0.005 mm, the variation caused by the increase in concentrations of the hydrophobic and soy lecithin plasticizers in the formulations, an effect observed previously (Bertan et al., 2005; Thomazine et al., 2005).

3.1. Mechanical Properties

The increase in the concentration of plasticizers (ATB and TB), independently of the type used, for all concentrations of lecithin studied, produced reduction in the value of the TS (Fig. 1). For concentration of lecithin of 10 g/100 g of plasticizer, where the largest values of TS were observed, the use of TB was more effective (102.54 MPa) in comparison with the use ATB (84.47 MPa).

Reduction of TS due to the increase in concentration of hydrophilic plasticizer is amply reported in specialized literature (Cuq, Gontard & Guilbert, 1997; Sobral et al., 2001; Sothornvit & Krochta, 2001; Srinivasa, Ramish & Tharanathan, 2007; Thomazine et al., 2005; Vanin et al., 2005). When compared to the addition of hydrophilic

composites, the addition of hydrophobic plasticizers (Fig. 1) produced films with greater values of TS, using similar levels of plasticizers. For 30% of plasticizers, the maximum attained values were 68.81 MPa (acetyltributyl citrate) and 68.86 MPa (tributyl citrate) against 47.81 MPa for 25% of sorbitol and 21.14 MPa for 25% of glycerol (Thomazine et al., 2005). The TS determined in fish-gelatin-based films plasticized with glycerol, sorbitol, ethylene glycol and polyethylene glycol, were also inferior to the present work, the maximum attained being 67.32 MPa for the addition of 25% of ethylene glycol (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan & Tanaka, 2006).

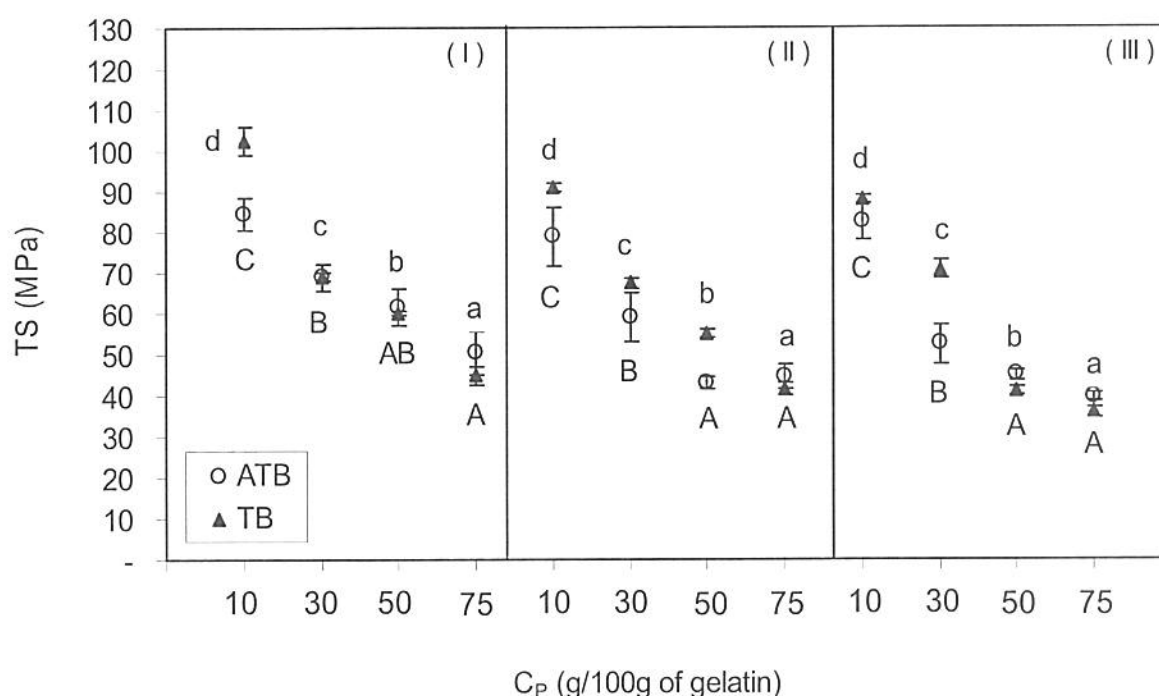


Fig. 1. Effect of the plasticizer (C_P) and lecithin (C_L) concentrations on tensile strength: (I) $C_L = 10$ g/100 g of plasticizer; (II) $C_L = 30$ g/100 g of plasticizer and (III) $C_L = 60$ g/100 g of plasticizer. Note: different letters inside the figure indicate significant difference between the averages ($p < 0.05$), capital letters represent acetyltributyl citrate (ATB) and lower case letters represent tributyl citrate (TB).

In the case of some synthetic polymers, TS values between 8.6 to 175 MPa were obtained (Gennadios, McHugh, Weller & Krochta, 1994). Lower values are found for low-density polyethylene LDPE, (8.6-17.3 MPa) and for co-polymer ethylene vinyl acetate EVA (13.8 MPa). Intermediate values were observed for high-density polyethylene (HDPE) which attained 34.6 MPa and for oriented polystyrene (OPS) with a range of 62.2-82.7 MPa, while the vinyl co-polymer and vinylidene chloride (PVDC) and ethylene polythereftalate (PET) were responsible for the highest values of TS, 138 and 175 MPa respectively (Gennadios, McHugh, Weller & Krochta, 1994).

The elongation values (*E* %, Table 1) indicate that when increased concentrations of hydrophobic plasticizers were added together with increased quantities of lecithin, *E* % tends to increase slightly when TB is used, with maximal variation of *E* % between 3.1 to 5.9% and of 4 to 12.2% in the case of ATB, without significant influence in the use of hydrophobic plasticizers, as well as in additions of soy lecithin emulsifiers, in the values of *E* %. On the other hand, the use of sorbitol and glycerol in gelatin films (Thomazine et al., 2005) promoted greater flexibility to films with *E* % value of 127% when 55% of glycerol was used. Greater flexibility in fish-gelatin films with elongation value of 98% for the addition of 75% glycerol was also observed (Jongjareonrak et al., 2006). According to the authors, glycerol, being a small-chain molecule with highly hygroscopic characteristics is easily inserted between the protein chains and attracts more water for the structure of the film, becoming more flexible. ATB and TB plasticizers are molecules with hydrophobic characteristics and present a more complex chain, probably the reason why the elongation results with the use of these plasticizers appear inferior to other works realized using hydrophilic plasticizers.

Table 1

Effect of concentration of plasticizer (C_p) and of the concentration of soy lecithin (C_L) in the variables: elongation (E), elastic modulus (EM), water vapor permeability (WVP) and opacity (O_p) of gelatin-based films plasticized with tributyl citrate (TB) and with acetyltributyl citrate (ATB).

C_p (g/100 g gelatin)	C_L (g/100 g plasticizer)	E (%)		EM (MPa)		WVP (g mm/m ² h kPa)		O_p (%)	
		TB	ATB	TB	ATB	TB	ATB	TB	ATB
10	10	4.76±0.59 ^{eg}	4.50±0.45 ^a	29.54±1.51 ^f	24.95±1.03 ^{ef}	0.25±0.03 ^{abc}	0.20±0.03 ^{ab}	18.7 ± 0.3 ^{ab}	16.9 ± 0.2 ^a
	30	3.39±0.22 ^{ab}	3.51±0.42 ^a	30.71±2.48 ^f	27.67±0.86 ^f	0.27±0.00 ^{abc}	0.17±0.03 ^a	20.5 ± 0.8 ^b	17.9 ± 0.1 ^a
	60	3.70±0.07 ^{abf}	4.47±0.37 ^a	28.89±0.39 ^f	23.87±0.28 ^{def}	0.18±0.05 ^a	0.17±0.01 ^a	17.5 ± 1.1 ^a	17.2 ± 0.3 ^a
30	10	3.44±0.28 ^{ab}	5.14±0.42 ^a	22.79±1.30 ^c	19.90±0.57 ^{cde}	0.26±0.03 ^{abc}	0.20±0.02 ^b	27.4 ± 2.3 ^d	21.5 ± 0.4 ^b
	30	3.94±0.27 ^{bc}	3.81±0.15 ^a	21.95±0.98 ^c	19.18±1.86 ^{cd}	0.32±0.06 ^{bc}	0.21±0.03 ^{ab}	30.3 ± 0.6 ^c	22.1 ± 0.5 ^b
	60	4.21±0.40 ^{bc}	3.35±0.16 ^a	24.24±1.06 ^c	16.23±5.17 ^{bc}	0.23±0.02 ^{ab}	0.23±0.01 ^b	24.0 ± 0.6 ^c	22.0 ± 0.7 ^b
50	10	4.60±0.27 ^{cd}	12.24±1.29 ^d	18.34±1.15 ^d	13.95±0.41 ^{ab}	0.28±0.02 ^{bc}	0.23±0.01 ^b	31.9 ± 0.6 ^{ef}	23.7 ± 0.2 ^{cd}
	30	4.65±0.16 ^{cd}	7.68±0.38 ^b	16.86±0.64 ^{cd}	10.64±1.38 ^a	0.22±0.03 ^a	0.23±0.01 ^b	30.7 ± 0.6 ^{eg}	24.5 ± 0.3 ^d
	60	3.06±0.17 ^a	8.53±0.92 ^{bc}	14.27±1.00 ^{bc}	10.99±0.55 ^a	0.24±0.02 ^{ab}	0.19±0.01 ^{ab}	31.7 ± 0.5 ^{ef}	23.4 ± 0.3 ^c
75	10	5.90±0.03 ^c	10.59±1.93 ^{cd}	12.34±0.59 ^{ab}	11.68±1.41 ^{ab}	0.30±0.03 ^{bc}	0.21±0.04 ^{ab}	33.9 ± 0.4 ^f	25.9 ± 0.1 ^c
	30	4.41±0.07 ^{cf}	11.30±0.27 ^d	11.97±0.52 ^{ab}	9.77±0.57 ^a	0.34±0.03 ^c	0.23±0.01 ^b	33.5 ± 0.5 ^f	25.6 ± 0.4 ^c
	60	5.36±0.45 ^{deg}	8.15±0.67 ^b	9.42±0.45 ^a	9.39±0.52 ^a	0.26±0.01 ^{abc}	0.24±0.02 ^b	33.1 ± 0.7 ^{fg}	24.4 ± 0.1 ^{cd}

Note: Average ± standard deviation. Different letters for the same column represent significant differences ($p < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

Reduction of TS and increase in E % with the increase of hydrophobic plasticizers were also observed by some authors (Gil, Saska & Negulescu, 2006; Labrecque et al., 1997; Wang et al., 2008). In films produced with vinyl poly-chloride plasticized with tributyl citrates and acetyltributyl, lesser reductions were observed in TS by the use of tributyl citrate, compared to films prepared with O-acetyltributyl (Gil et al., 2006). Similarly, in polylactic acid films plasticized with citrate esters, a higher value of TS was observed for films with the addition of tributyl citrate in relation to the citrate acetyltributyl plasticizer (Labrecque et al., 1997). The TS values observed in this work for gelatin-based films plasticized with ester citrates varied from 36 MPa to 103 MPa, superior to those found in the literature of similar levels of these same plasticizers, being 29.8 MPa for vinyl polychloride plasticized with 15% of acetyltributyl citrate (Gil et al., 2006), 22.4 MPa for polylactic acid plasticized with 10% of tributyl citrate (Labrecque et al., 1997) and 14.3 MPa for poly-3-hydroxybutyrate with the addition of acetyltributyl citrate (Wang et al., 2008).

The values of elasticity modules (EM, Table 1) decreased with the increase of concentrations of hydrophobic plasticizers, presenting significant effects such as those observed for the TS (Table 1). The increase in quantities of lecithin, with a fixed concentration of plasticizers, independently of the type used, did not produce changes in the EM values.

3.2. Properties of water vapor barrier

In general, the increase in quantities of plasticizers slightly increased the values of water permeability obtained (WVP, Table 1), however, a similar behavior was observed

without significant differences, when hydrophilic plasticizers were used (Jongjareonrak et al., 2006; Sobral et al., 2001; Thomazine et al., 2005; Vanin et al., 2005). The increase in the quantity of lecithin slightly increased the WVP, also without significant differences among the results. Slightly inferior values were observed for the WVP with the addition of ATB in relation to films with added TB. This behavior may be due to the ATB plasticizer characteristic, which is less polar than the tributyl citrate, as that has an acetyl group, a greater number of unsaturations and a higher molar mass. Differences in the nature of plasticizers used may produce different abilities to attract water molecules for the filmogenic network (Jongjareonrak et al., 2006).

The WVP values obtained for films containing hydrophobic plasticizers with gelatin/lecithin were slightly inferior or similar to those observed in the literature for gelatin films with added hydrophilic plasticizers: 0.54-0.95 g mm/m² h kPa (Thomazine et al., 2005), 0.30-0.59 g mm/m² h kPa (Vanin et al., 2005), 0.17-0.38 g mm/m² h kPa (Sobral et al., 2001) e 0.44-1.23 g mm/m² h kPa (Jongjareonrak et al., 2006). The introduction of the hydrophilic plasticizers of low molecular mass may reduce interactions of protein-protein, producing an increase in molecular mobility, thus facilitating migration of water vapor (Oliarc, Rouilly, Silvestre & Rigal, 2003; Rodríguez et al. 2006; Sobral et al., 2001; Thomazine et al., 2005). In addition, it may provoke a reorganization of the protein network which becomes less dense with a larger free volume (Cuq et al., 1997; Oliarc et al., 2003), facilitating greater mobility of the solvent and as a consequence, greater water diffusion by the film matrix (Sobral et al., 2001). The addition of an emulsifier may also have diminished the humidity content of the films, due to the interaction of hydrogen bridges between the hydrocolloid and the polar groups of the emulsifier, thus reducing the number of polar groups available to interact with the water molecules (Villalobos, Hernández-

Munoz & Chiralt, 2006).

When compared to WVP value obtained for the simple gelatin film ($0.54 \pm 0.03 \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$), the values of permeability to water vapor were inferior, for both types of hydrophobic plasticizers used, indicating that the addition of plasticizers exerted a barrier effect. Despite the reduced WVP values observed for the gelatin films to which hydrophobic plasticizers were added, the order of magnitude of the values obtained are still superior to those found for synthetic plastics, with the exception of the cellophane WVP, the value of which is equal to $0.30 \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$, while for low-density and high-density polyethylenes the WVP reported is equal to 3.33×10^{-3} and $8.33 \times 10^{-4} \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$, respectively. For EVOH, ethylene co-polymer and vinyl alcohol, the WVP is $1.05 \times 10^{-2} \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ (McHugh & Krochta, 1994b).

3.3. Opacity

The films obtained, independently of formulation, appeared opaque, with slight yellowish coloration due to the presence of the soy lecithin emulsifier, which contains a brownish coloration. It may be observed on Table 1 that the increase in concentration of plasticizer (TB or ATB) provoked an increase in opacity ($p < 0.05$). A similar behavior was found in gelatin-based films and Brazilian elemi (Bertan et al., 2005), and films produced with protein isolated from milk whey, with the addition of fatty acids (Fernández, Apodaca, Cebrián, Villarán & Maté, 2007). Films plasticized with TB were more opaque than those plasticized with ATB. In many applications an increased opacity is undesirable, although some applications need to provide protection against reactions of deterioration produced by

the effect of light, offering some advantage to this type of film.

In general, the films composed of gelatin, hydrophobic plasticizers and soy lecithin emulsifiers present opacity values that are superior to those observed for gelatin-based films and hydrophilic plasticizers, with an indication that these are more transparent than the others. (Vanin et al., 2005).

3.4. Morphology

3.4.1. Scanning Electron Microscopy

For the surface and internal structure (Fig. 2), the films presenting the lowest and the highest WVP values containing TB, ATB and lecithin, were selected. These films also contained the highest and lowest quantities of the two plasticizers studied and the differences in surface and internal structure morphology could be clearly observed.

Films containing the lowest quantities of plasticizers (Fig. 2a, ATB and Fig. 2e, TB) presented regular and more homogeneous surfaces, while higher quantities of plasticizers produced more heterogeneous surfaces, indicating possible separation of phases, at least partially, with possible lipid exudation, not visually observed (Fig. 2c, ATB and Fig. 2g, TB). This effect was observed previously, where the addition of lipid materials produced irregularities on the surface of emulsified films containing methylcellulose (Martin-Polo, Mauguin & Voilley, 1992) and in gellan gum films composed of stearic and palmitic acid (Yang & Paulson, 2000).

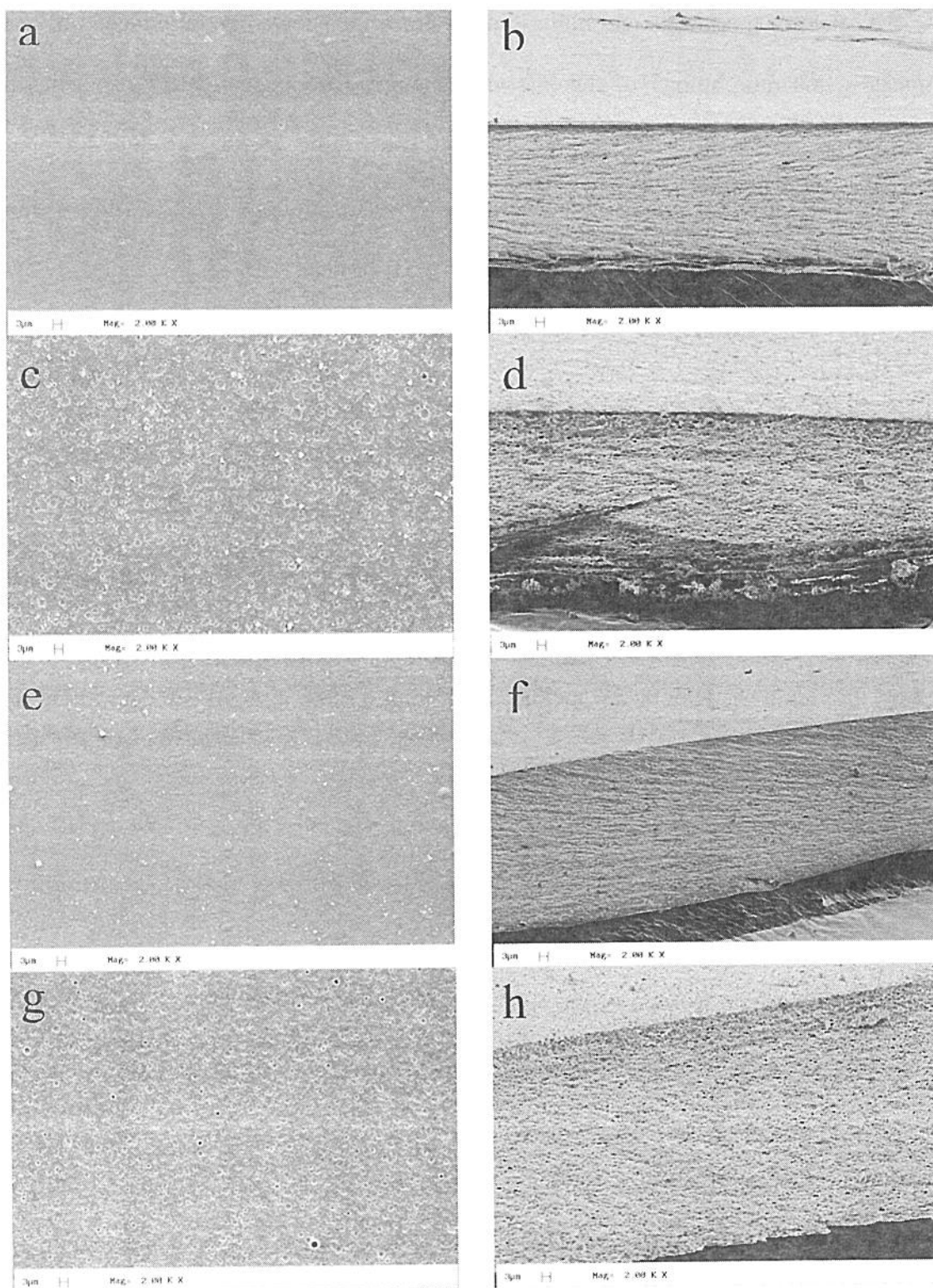


Fig. 2. Micrographs by SEM of surface (left column) and internal structure (right column) of gelatin films: (a) and (b) film containing 10 g of ATB/100 g gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of ATB; (c) and (d) film containing 75g of ATB/100g gelatin plus 30 g of lecithin/100 g ATB; (e) and (f) film containing 10 g of TB/100 g gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of TB; (g) and (h) film containing 75 g of TB/100 g gelatin plus 30 g of lecithin/100 g of TB (bars = 3 μ m).

The effect of the lowest and highest quantities of plasticizer also produced obvious differences in the morphology of the internal structure, independently of the plasticizer used. Lower quantities of plasticizer (Fig. 2b, ATB and Fig. 2f, TB) produced a more compact internal structure and lower quantities of discontinuous zones, while higher quantities of plasticizer (Fig 2d, ATB and Fig. 2h, TB) produced higher heterogeneity and apparently less compaction.

3.4.2. Laser Scattering Confocal Microscopy

For laser scanning confocal microscopy the two films presenting the lowest values of WVP for each one of the plasticizers ATB and TB were selected. These films contained 10% of plasticizer in relation to protein and 60% of lecithin in relation to the plasticizer. The same formulations without the inclusion of lecithin were also prepared to allow the evaluation of the emulsifying effect of the lecithin. In all formulations, the lipid material was dyed with Nile Red fluorescent composite and the gelatin dyed with fluorescent composite FITC. Fig. 3 presents the superposition of images (merge mode) obtained for the fluorescent compounds.

For films without lecithin containing the plasticizer ATB (Fig. 3a) or containing TB (Fig. 3c), the presence of lipid globules of different sizes is observed, indicating the presence of two phases and the non-homogeneous incorporation of the lipid material in the protein matrix. Similar effect was observed in films containing gelatin, triacetate and lipid composites where the confocal microscopy showed a heterogeneous distribution of lipid globules, indicating the lack of incorporation/miscibility of the hydrophobic portion to the protein matrix. (Bertan et al., 2005).

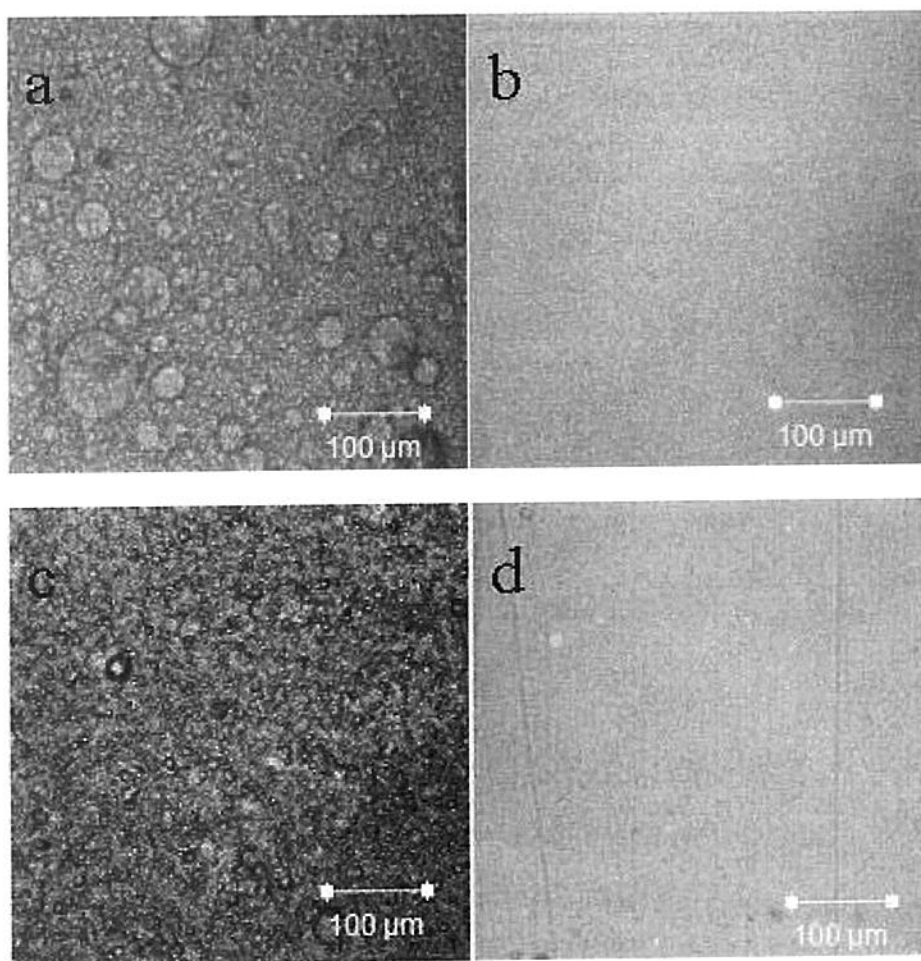


Fig. 3. Micrographs using merge mode, obtained by CLSM of gelatin films (gelatin + FITC and plasticizers and lecithin + Nile Red): (a) film containing 10 g of ATB/100 g gelatin without lecithin; (b) film containing 10 g of ATB/100 g protein plus 60 g of lecithin/100 g of ATB; (c) film containing 10 g of TB/100 g gelatin without lecithin, and (d) film containing 10 g of TB/100 g gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of TB (bars = 100µm).

In the formulations where lecithin was added together with the plasticizers (Fig. 3b, ATB and d, TB) the emulsifying effect caused by the lecithin clearly appears, showing only a homogeneous phase, without the presence of lipid globules and indicating good incorporation of the hydrophobic material into the protein matrix, independently of the plasticizer used. However, this good incorporation into the protein matrix of the

hydrophobic material was not reflected in differences as to values obtained for the WVP, also independently of the plasticizer used (ATB or TB), although in previous works it was observed that the homogeneous distribution of the hydrophobic globules and their smaller size favor the improvement in the properties of the water vapor barrier (McHugh & Krochta, 1994a; Péroval, Debeaufort, Despré & Voilley, 2002).

3.5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

The specters in the region of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, using FT-IR, for films containing ATB and TB presenting the highest and lowest values of WVP respectively, for 75% of plasticizer w/w of protein and 30% of lecithin w/w of plasticizer and 10% of plasticizer w/w of protein and 60% of lecithin w/w of plasticizer may be observed in Fig. 4a and Fig. 4b. In Fig. 4a (ATB) and Fig. 4b (TB) peak characteristics of gelatin-based films are observed (spectrum 1) in function of the contents of hydrophobic and lecithin plasticizers (spectrums 2 and 3).

The band centered around 3300 cm^{-1} is mainly due to the extension of the group N-H of amide A. The intense bands between $1700\text{ and }1600\text{ cm}^{-1}$ and between $1600\text{ and }1500\text{ cm}^{-1}$, are known, respectively, as bands of amide I (extension of C=O) and amide II (extension of C-N and angular deformation of the N-H ligation), both of the peptide groups. Amide III, with bands between $1200\text{ and }1400\text{ cm}^{-1}$, represent components of the extension of C-N and N-H on the flexion surface of amide bonds and absorptions resulting from the vibrations of groups C-H₂ of the glycine and proline (Mantsch & Chapman, 1996; Prystupa & Donald, 1996; Sionkowska, Wisniewski, Skopinska, Kennedy & Wess, 2004).

For the films with ATB and TB (Fig. 4a and Fig. 4b), small dislocations were

observed on the peak of amide A (spectrums 2 and 3), this band being situated at 3325 cm^{-1} to the simple gelatin film (spectrum 1) and situated at 3286.65 cm^{-1} (spectrum 2) and at 3371.25 cm^{-1} (spectrum 3) when 10% and 75% of the plasticizers were, respectively, incorporated into the formulations. The addition of ATB or TB, at the concentration levels of 10% and 75%, provoked a dislocation of approximately 13 cm^{-1} for the amide I band, when compared to the spectrum of the simple gelatin film. The same behavior was observed for the amide II band (Fig. 4a and Fig. 4b).

The amide III band is characterized as presenting more than one peak, with a main absorption of around 1380 and 1400 cm^{-1} , and small peaks situated between 1300 and 1200 cm^{-1} . The peaks of this band appear distinct between the two plasticizers used, with differentiated formats and intensities, mainly in the length of waves which correspond to 1400 cm^{-1} and 1200 cm^{-1} . In this case, there could be an indication of possible new interactions among the hydrophobic plasticizers, soy lecithin and the protein responsible for structure of the film.

The characteristic peaks of the studied bands increase their amplitude according to the increase in the contents of plasticizers (ATB and TB), the same behavior was observed for gelatin films with glycerol addition, where the increase of concentration of the plasticizer indicates increase in the quantity of free water in the system, causing increase in the amplitude of the corresponding peaks (Bergo & Sobral, 2007).

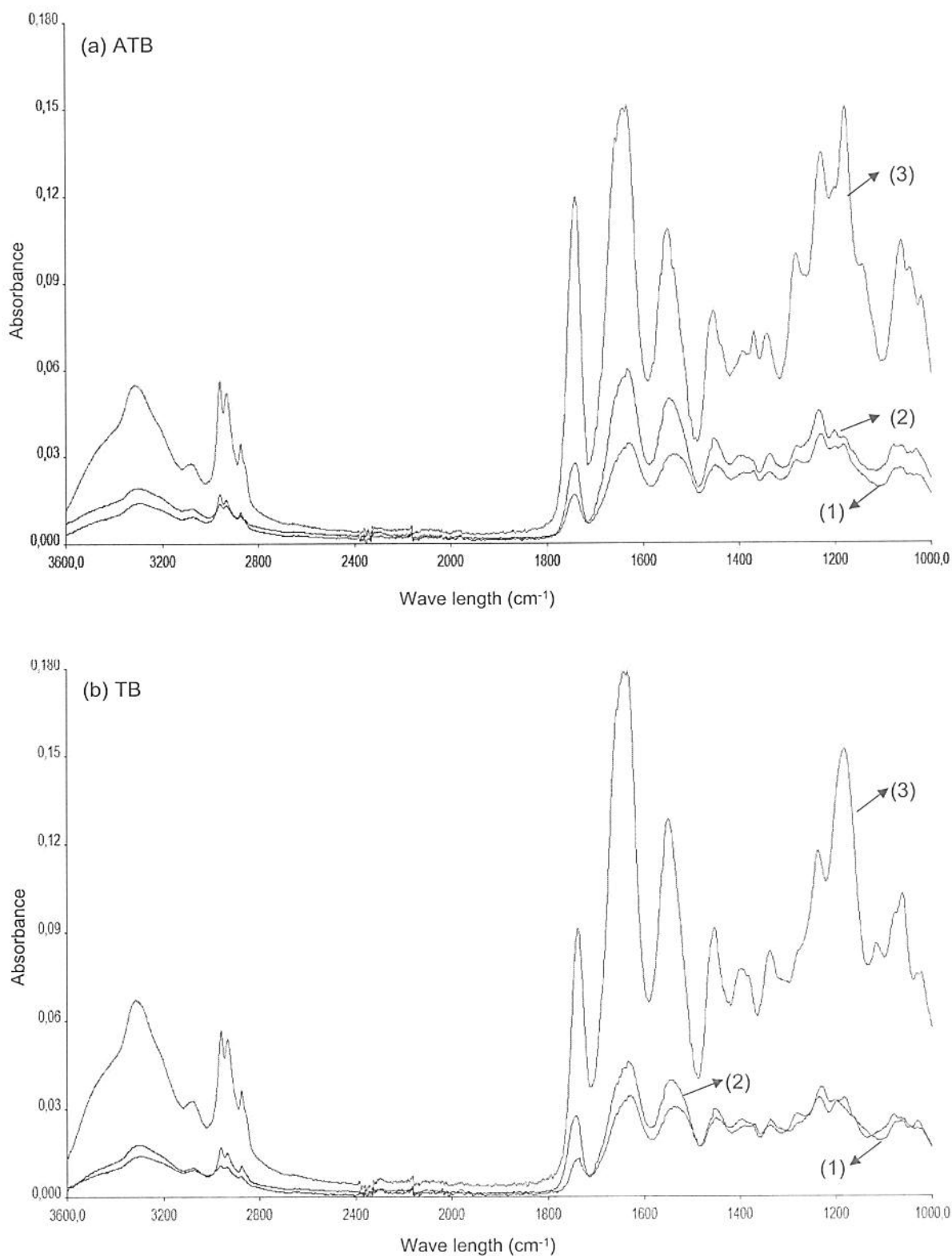


Fig. 4. FT-IR spectrum of gelatin films containing: (a) ATB and (b) TB. (1) Simple gelatin film, (2) 10g of plasticizer/100 g of gelatin plus 60 g of lecithin/100 g of plasticizer and (3) 75 g of plasticizer/100 g of gelatin plus 30 g of lecithin/100 g of plasticizer.

4. Conclusions

The use of ester citrate derivatives in gelatin-based filmogenic formulations proved feasible, generating flexible materials. The increasing addition of hydrophobic plasticizers has significantly diminished the TS. Such behavior is similar to that described for films prepared with hydrophilic plasticizers. Regarding water vapor permeability, it was determined that the use of hydrophobic plasticizers caused a slight reduction as observed for gelatin films prepared with glycerol and sorbitol. The addition of soy lecithin, a natural surfactant with large use in food products, produced better incorporation of the apolar plasticizers in the hydrophilic filmogenic solution, as verified through confocal microscopy.

References

- ASTM D 523 (1999). *Standard test method for specular gloss*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 882-95 (1995b). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM E 96-95 (1995a). *Standard test methods for water vapor transmission of materials*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Bergo, P., & Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1285-1289.
- Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*,

19, 73-82.

- Callegarin, F, Gallo, J. A. Q, Debeaufort, F., & Voilley, A. (1997) Lipids and Biopackaging. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 74, 1183-1192.
- de Carvalho, R.A., Sobral, P.J.A., Thomazine, M., Habitante, A.M.Q.B, Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C., & Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22, 1117-1123.
- Chen, C.H., & Lai, L.S. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids*, 22, 1584-1595.
- Cheng, L. H., Abd Karim, A., & Seow, C. C. (2008). Characterization of composite films made of konjac glucomannan (KGM), carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid. *Food Chemistry*, 107, 411-418.
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as effect by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 662-626.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1996). Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, 61, 580-584.
- Fernández, L., Apodaca, E. D., Cebrián, M., Villarán, M. C., & Maté, J. I. (2007). Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. *European Food Research and Technology*, 224, 415-420.
- Gennadios, A., Mchugh, T. H., Weller, C. L., & Krochta, J. M. (1994). Edible coatings and films based on proteins. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin, & M. O. Nisperos-Carriedo

- (Eds.), *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 201-277). Lancaster: Technomic Publishing Co. Inc.
- Gil, N., Saska, M., & Negulescu, I. (2006). Evaluation of the effects of biobased plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly (vinyl chloride). *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 1366-1373.
- Gontard, N., Marchesseau, S., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1995). Water vapor permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids. *Journal of Food Science and Technology*, 30, 49–56.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222, 229-235.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2007). Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 21, 879-888.
- Kristo, E., & Biliaderis, C. G. (2006). Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, 20, 1057-1071.
- Labrecque, L. V., Kumar, R. A., Davé, V., Gross, R. A., & McCarthy, S. P. (1997). Citrate esters as plasticizer for poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 66, 1507-1513.
- Lamprecht, A., Schaffer, U. F., & Lehr, C.M. (2000). Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: Structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 1–9.

- Lee, S., & Shiraishi, N. (2001). Plasticization of cellulose diacetate by reaction with maleic anhydride, glycerol, and citrate esters during melt processing. *Journal of Applied Polymer Science*, 81, 243-250.
- Mantsch, H. H., & Chapman, D. (1996). *Infrared spectroscopy of biomolecules*. New York: Wiley-Liss.
- Martin-Polo, M., Mauguin, C., & Voilley, A. (1992). Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. I. Influence of the preparation technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 407-412.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994a). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 71, 307-312.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994b). Permeability properties of edible films. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin, & M. O. Nisperos-Carriedo (Eds.). *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 139-197). Lancaster: Technomic Publishing Co. Inc.
- Oliarc O., Rouilly, A., Silvestre, F., & Rigal, L. (2003). Effect of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18, 91-100.
- Péroval, C., Debeaufort, F., Despré, D., & Voilley, A. (2002). Edible arabinoxylan-based films. I. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 3977-3983.
- Prystupa, D. A., & Donald, A. M. (1996). Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. *Polymer Gels and Network*, 4, 87-110.
- Rahman, M., & Brazel, C. S. (2004). The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science*,

29, 1223-1248.

- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39, 840-846.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C. J., & Wess, T. J. (2004). Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 25, 795-801.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinguer, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15, 423-432.
- Sobral, P. J. A., Santos, J. S., & Garcia, F. T. (2005). Effect of protein and plasticizer concentrations in films forming solutions on physical properties of edible and films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. *Journal of Food Engineering*, 70, 93-100.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1113-1122.
- Thomazine, M., Carvalho, R. A., & Sobral, P. J. A. (2005). Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. *Journal of Food Science*, 70, 172-176.
- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). Effect of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin based films. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-907.
- Vicentini, N. M. (2003). Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula

de mandioca para uso em pós-colheita. PhD thesis. Botucatu: UNESP. 198p.

- Villalobos, R., Hernández-Munoz, P., & Chiralt, (2006). A. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-509.
- Wang, L., Zhu, W., Wang, X., Chen, X., Chen, G-Q., & Xu, K. (2008). Processability modifications of poly(3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending and stabilizing. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 166-173.
- Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33, 571-578.

CAPÍTULO 4

**“Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin
from *Yucca schidigera* as the surfactant”**

Food Research International, v.43, p.1710-1718, 2010

Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant

Caroline Andreuccetti^a, Rosemary A. Carvalho^b, Carlos R. F. Grosso^{a*}

^aDepartment of Foods and Nutrition, Faculty of Food Engineering, P.O. Box 6121, University of Campinas, UNICAMP, 13083-862 Campinas, SP, Brazil.

^bFood Engineering Department, ZEA-FZEA, P.O. Box 23, University of São Paulo, USP, 13635-900 Pirassununga, SP, Brazil.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the incorporation of hydrophobic plasticizers (acetyltributyl citrate - ATB, tributyl citrate - TB and acetyltriethyl citrate - ATC) in a matrix of gelatin, using the saponin extracted from *Yucca schidigera* (yucca) as emulsifier, in the production of biodegradable emulsified films using the casting technique. High levels of hydrophobic plasticizers were incorporated, reaching up to 75% of plasticizer in relation to the protein (w/w) for ATB and TB, and up to 60% for ATC. The minimum values of water vapor permeability (WVP) were 0.08, 0.07 and 0.06 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹ for ATB, TB and ATC respectively, with no significant differences ($p > 0.05$). The water solubility of the films ranged from 21 to 59.5%. Although the WVP decreased, both scanning electron microscopy and laser scanning confocal microscopy indicated that the

* Corresponding author. Tel.: +55-19-35214079; fax: +55-19-35214060.
E-mail address: grosso@fea.unicamp.br (C.R.F. Grosso)

incorporation of the hydrophobic plasticizers did not occur homogeneously in the film matrix.

Keywords: Emulsified films, Gelatin, Citrate esters, Saponin, *Yucca schidigera*.

1. Introduction

Technologies based on renewable and biodegradable materials are required in all productive sectors. Biodegradable plastics can offer alternatives for disposal and biodegradation when compared to synthetic packaging and proteins, polysaccharides and lipids are the natural polymers most used in the production of biofilms. Plasticizers can be also used to increase the flexibility and elongation of the films (Banker, 1966) and of these, glycerol and sorbitol are the most widely used in protein films (Carvalho et al., 2008; Kristo & Biliaderis, 2006; Thomazine, Carvalho, & Sobral, 2005), although they also increase susceptibility to environmental humidity.

Protein-based formulations generally produce films with good mechanical resistance, however they are hygroscopic, while the inclusion of hydrophobic compounds improves the water vapor barrier and decreases the mechanical resistance of films (Krochta, 2002), so indicating that the combination of lipids and proteins may generate synergy with respect to the functionality of the films resulting from this combination (Krochta & de Mulder-Johnston, 1997).

The use of hydrophobic compounds added as a layer or in the form of an emulsion to plasticize the proteins has been shown to be effective in reducing the water vapor permeability of composite films (Pommet, Redl, Morel, & Guilbert, 2003). Results

presented in the literature have shown that bilayer laminated films are more efficient with respect to water vapor permeability (WVP), but the production process requires more steps when compared to emulsified films (Debeaufort & Voilley, 1995). An extensive review concerning the use of lipids as plasticizers in edible films has already been published (Morillon, Debeaufort, Blond, Capelle, & Voilley, 2002).

Among the hydrophobic plasticizers are citrate esters, derived from citric acid (Labrecque, Kumar, Davé, Gross, & McCarthy, 1997), which were studied with the aim of improving the functionality of degradable films (Ljungberg & Wesslén, 2002; Wang et al., 2008). Besides the differences with respect to molecular weight, the plasticizers have different chemical groups, where two with acetyl group (acetyltributyl citrate and acetyltriethyl citrate) and the other containing one alcohol group inside the molecule (tributyl citrate), which could provide different levels of hydrophobicity. Also, they present differences with respect to geometric conformation with one more open structure observed by tributyl series.

When materials with different hydrophobicity are mixed, the addition of an emulsifier is required to allow a homogeneous dispersion of the hydrophobic material in the hydrophilic protein matrix (Krochta, 2002). Emulsifiers are widely used in the food industry, some of which were used to develop macromolecule based-films including the Tweens (Bravin, Peressini, & Sensidoni, 2004; Rodríguez, Osés, Ziani, & Maté, 2006), Spans (Díaz-Sobac & Beristain, 2001; Villalobos, Chanona, Hernández, Gutiérrez, & Chiralt, 2005), fatty acid salts and phospholipids such as lecithin (Andreuccetti, Carvalho & Grosso, 2009; Rodríguez et al., 2006).

Saponins are glycosides that can be found in abundance in the vegetable kingdom, containing a genin portion (sapogenin or aglycone) that may be steroidal or triterpenic, and

a second portion consisting of one or more sugar chains (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007). Due to the presence of a lipid-soluble aglycone and water soluble sugar chain(s) in their amphiphilic structure, saponins are surface active compounds with detergent, wetting, emulsifying and foaming properties (Sarnthein-Graf & La Mesa, 2004). Many sources of saponins are commercially used, but only two are currently approved as food additives: extracts of *Quillaya saponaria* (quilaya) and *Yucca schidigera* (yucca), containing triterpenic and steroidal saponins, respectively. Yucca is classified as a food additive in the US under section 172.50 (Natural Flavoring Substances and Natural Substances Used in Conjunction with Flavors) (US Food and Drug Administration, 2003).

The aim of this study was to evaluate the effect of the saponin extracted from *Y. schidigera* as a surfactant agent in the incorporation of hydrophobic plasticizers (citrate esters) for the production of gelatin based biodegradable films using the casting technique. The barrier and mechanical properties, morphology of the film surface and cross-section, droplet size of the film-forming emulsions and possible interactions amongst the constituents, were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following materials were used to produce the films: type A pig hide gelatin (260 bloom) donated by Gelita do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brazil), tributyl citrate (TB, 360.4 Da), acetyltributyl citrate (ATB, 402.5 Da), acetyltriethyl citrate (ATC, 318.3 Da)

donated by Morflex, Inc. (Greensboro, North Carolina, USA) and liquid *Y. schidigera*, donated by Beraca Sabará Químicos e Ingredientes Ltda. (content of steroidal type saponins ~10%, as informed by the manufacturer).

2.2. Preparation of biodegradable films

The films were prepared using casting techniques, with a fixed gelatin concentration of 4 g 100 g⁻¹ of film-forming solution. The tributyl citrate (TB), acetyltributyl citrate (ATB) and acetyltriethyl citrate (ATC) plasticizers were added in concentrations (Cp) of 10, 20, 30, 40 50, 60 and 75 g 100 g⁻¹ of gelatin. *Y. schidigera* (yucca) was used as the emulsifier in concentrations of 10, 30 and 60 g 100 g⁻¹ of plasticizer. For the preparation of the film-forming solution (FFS), the gelatin was hydrated at room temperature (25 ± 2 °C) for 30 min, followed by dissolution at 55 °C for 15 min. The plasticizers were added in ethanol (10 g 100 g⁻¹ of filmogenic solution) and the yucca in distilled water (10 g 100 g⁻¹ of filmogenic solution) at room temperature, and then manually mixed. The solubilized gelatin was added and the mixture homogenized at 10,000 rpm for 10 min using a homogenizer (UltraTurrax IKA, T18, Werke, Germany). The homogenized mixture was vacuum-filtered to reduce the air bubbles formed during agitation. The filmogenic solution obtained was dispersed on acrylic plates (20 x 12 cm) and maintained at room temperature (25 ± 2 °C; 50–60%, Relative Humidity, RH) to dry.

Preliminary tests were performed to determine the most suitable film thickness for the different filmogenic solutions containing different concentrations of the plasticizers and yucca extract. This verification was important in order to maintain the final thickness

constant amongst the different formulations studied. After drying and before characterization, the films were maintained in desiccators (25 ± 2 °C, $50 \pm 2\%$ RH, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) for 7 days.

2.3. Film characterization, visual aspects and thickness

Visual and tactile analyses were carried out with the aim of using only homogeneous films showing no phase separation, exudation, insoluble particles or brittle zones, with a uniform color and easy to remove from the acrylic supports. Films that did not present these characteristics were discarded. The film thickness was determined using a Mytutoyo Corp. digital micrometer (Tokyo, Japan), calculating the average of 10 random measurements.

2.4. Mechanical properties

The tensile strength (TS) and elongation (%E) of the films (100 x 25 mm), calculated as the average of 10 determinations, were determined using a model TA-XT2 texturometer (TA Instruments, Newcastle, USA) according to the ASTM D882-95 method (ASTM, 1995a). The initial distance of separation and velocity were adjusted to 50 mm and 1 mm s^{-1} , respectively, with a 5 kg load cell.

2.5. Water vapor permeability

Water vapor permeability (WVP, $\text{g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$) was determined at 25 ± 2 °C according to the ASTM E96-95 method (ASTM, 1995b). The inside of the cells was filled

with anhydrous calcium chloride (0% RH). The cells were covered with the conditioned films, sealed and placed in desiccators containing a saturated NaCl solution ($75 \pm 3\%$ RH). The samples were weighed five times during a 48 h period and the determinations carried out in triplicate. The data were recorded on a weight gain vs. time graph. The coefficient of the straight line, obtained by linear regression, was determined and the WVP calculated (Andreuccetti et al., 2009).

2.6. Opacity

Film opacity was determined using a Hunterlab colorimeter (Colorquest II, Reston, VA, USA). The opacity was measured according to the ASTM D 523 method (ASTM, 1999), using a D65 day light source. The determinations were made in triplicate after calibration using standard black and white backgrounds, where the opacity (Op) = $(Opb/Opw) \times 100$, Op being the percent opacity of the film, Opb the opacity of the film against a black background, and Opw the opacity of the film against a white background.

2.7. Water solubility

The solubility of the films (2 cm discs) was determined according to Gontard, Duchez, Cuq, and Guilbert (1994) after 24 h of immersion in distilled water (50 ml), with slow stirring (Shaker Marconi-MA141, São Paulo, Brazil) at room temperature (25 ± 2 °C). The samples were then removed from the solution and dried in a forced air oven (105 °C for 24 h). The initial mass was also determined from the sample moisture content. The

difference in weight after drying was used to calculate the water soluble matter as a percentage of the initial dry weight.

2.8. Emulsion droplets size and film morphology

The morphological analyses were carried out on the formulations giving lower WVP values for the plasticizers studied, and formulations with no added surfactant were also analysed by optical and confocal laser scanning microscopies. Immediately after preparing each FFS emulsion, some droplets were placed on glass slides and their size examined using conventional optical microscopy (Carl Zeiss, model JenaVal) with a 1.25 optovar and magnifications of 40x and 100x (by immersion). The images were obtained using a MC-D130U PEMB 31 camera connected to Image Tool for Windows Software, Version 3.00 (UTHSCSA, San Antonio, Texas, USA), and the emulsion droplet size measured using MIAS 2008 En Version 2.2 (Anatomic Micro Image Analysis Software, Linton, Cambridge, England). The mean diameter (d_m) was evaluated considering 500 emulsion droplets for each FFS emulsion.

2.8.1. Scanning electron microscopy

The films were equilibrated in desiccators containing silica gel (25 °C) for a period of 7 days and then fractured with liquid nitrogen. The samples were coated with gold in a sputter coater POLARON SC7620 (Ringmer, England) at 3-5 mA for 180 s, and the morphological observations of the film surface and internal structure carried out using a scanning electron microscope LEO 440i (Cambridge, England) at 5 kV.

2.8.2. Confocal Laser Scanning Microscopy

The film morphology was also observed using a CARL-ZEISS LSM 510 META (Oberkochen, Germany) confocal laser scanning microscope (CLSM). The laser was adjusted to the green/red fluorescence mode, which yielded two excitation wavelengths (488 and 514 nm). Green and red fluorescent images were obtained from these two separate channels and the images then merged. For all observations the height was adjusted to half the thickness of the films. The dissolved gelatin was stained with fluorescein isothiocyanate, FITC (Lamprecht, Schaffer, & Lehr, 2000), with modification of the concentration, 20 μl FITC g^{-1} of protein. After addition of the dye, the protein solution was stirred for 1 h at 40 °C before use. The plasticizer and yucca were dyed with Nile Red (1 mg 30 g^{-1} of hydrophobic substance) according to the same reference, and the films produced as in Section 2.2. After conditioning, small pieces of film were fixed to glass slides and observed by CLSM.

2.9. Infrared Spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses were carried out according to Vicentini (2003) using a Perkin Elmer - Spectrum 2000 FT-IR (Massachusetts, USA) spectrometer with a Universal attenuated total reflectance (UATR) accessory, at room temperature. Films were placed in the support and pressed by the measuring sensor. Ten scans were done for each sample in a spectral range of 400-4000 cm^{-1} and a resolution of 4 cm^{-1} . This analysis was only applied to the films that gave lower WVP values.

2.10. Experimental design and statistical analysis

The experimental design included three different plasticizers and each one was studied at seven different levels. At each level, three different yucca concentrations were used, producing 21 formulations for each plasticizer. For opacity, water solubility, and the mechanical and water vapor barrier properties, at least three determinations were obtained for each film. The statistical analyses were carried out using SAS for Windows Version 8.0 (Cary, North Carolina, USA) and the differences between the means were determined by the Tukey multiple test ($p \leq 0.05$).

3. Results and discussion

Homogeneous films with no apparent exudation, brittle areas or pores and easily removable from the acrylic plates, were obtained with the use of yucca as a surfactant. However, different capacities to incorporate the plasticizers were observed, reaching maximum incorporation with no apparent exudation with 75 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin for ATB or TB and 60 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin for ATC. Previously, when lecithin was used as the surfactant and the same plasticizers were evaluated, films showing no exudation were only obtainable with the plasticizers ATB and TB, and it was not possible to incorporate ATC even at the lowest level investigated (10 g of plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin), producing visible exudation on the surface of the film obtained (Andreuccetti et al., 2009). For a better comparison of the effects produced by the different plasticizers, results referring to the addition of 10-60 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin, associated with

three different levels of surfactant (10, 30 and 60 g yucca 100 g⁻¹ of plasticizer) will be presented, excluding the results obtained for 75 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin obtained for ATB and TB.

In addition to an appropriate visual appearance of the films studied, the drying period under ambient conditions was approximately 8 h, regardless of the plasticizer used, as compared to the 18 h necessary to dry the films when lecithin was used in the formulations. The average moisture content for films containing yucca extract plus hydrophobic plasticizers varied between 7% and 12%, values higher than the obtained when the same plasticizers and lecithin were used to produce gelatin-based films (Andreuccetti et al., 2009).

The possibility of including ATC and the reduced film drying time were a consequence of the use of yucca in the formulations, and its possible interactions with the plasticizers and the protein matrix responsible for the production of the films. Amphiphilic surfactant molecules soluble in water can bind to protein molecules by electrostatic interactions in the case of ionic surfactants, and also by hydrophobic interactions (Pugnali, Dickinson, Ettelaie, Mackie, & Wilde, 2004). In the case of yucca, a non-ionic saponin containing sugars, hydrophobic interactions with the protein and the hydrophobic plasticizer and associations via hydrogen bonds with polar groups of the protein, may be favored, as observed for films containing amphiphilic surfactants and modified starches or hydroxypropyl methyl cellulose (Chen, Kuo, & Lai, 2009; Villalobos, Hernández-Munoz, & Chiralt, 2006).

The thickness of the gelatin based emulsified films ranged from 30 to 40 µm, regardless of the plasticizer used.

3.1 Mechanical properties

An increase in the plasticizer concentration produced a decrease in the TS value of the resulting films, regardless of the type of plasticizer and yucca concentration used (Fig. 1). Higher values for TS (MPa) were obtained at the lowest plasticizer concentration used (10 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin and 30 g yucca 100 g⁻¹ of plasticizer): 92.4 (ATC); 90.7 (TB) and 88.5 (ATB), without significance difference between them, while lower values were obtained at the highest plasticizer concentration (60 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin): 57.6 (ATC) and 57.5 (TB) for 30 g yucca 100 g⁻¹ of plasticizer and 51.3 (ATB) for 60 g yucca 100 g⁻¹ of plasticizer. A similar pattern was observed when lecithin was used as a surfactant for ATB and TB, with a decrease in TS with increasing plasticizer concentration in the filmogenic formulation, obtaining TS values ranging from 45 to 102 MPa (Andreuccetti et al., 2009), or for ATB in films produced with synthetic polymers such as poly(3-hydroxybutyrate) (Wang et al., 2008) and citrate esters in poly(lactic acid) (Labrecque et al., 1997).

Films produced with hydrophilic plasticizers behaved similarly to those observed in the present study, an increase in the concentration of these compounds causing a reduction in the tensile strength of the films (Sothornvit & Krochta, 2001; Thomazine et al., 2005; Srinivasa, Ramesh, & Tharanathan, 2007).

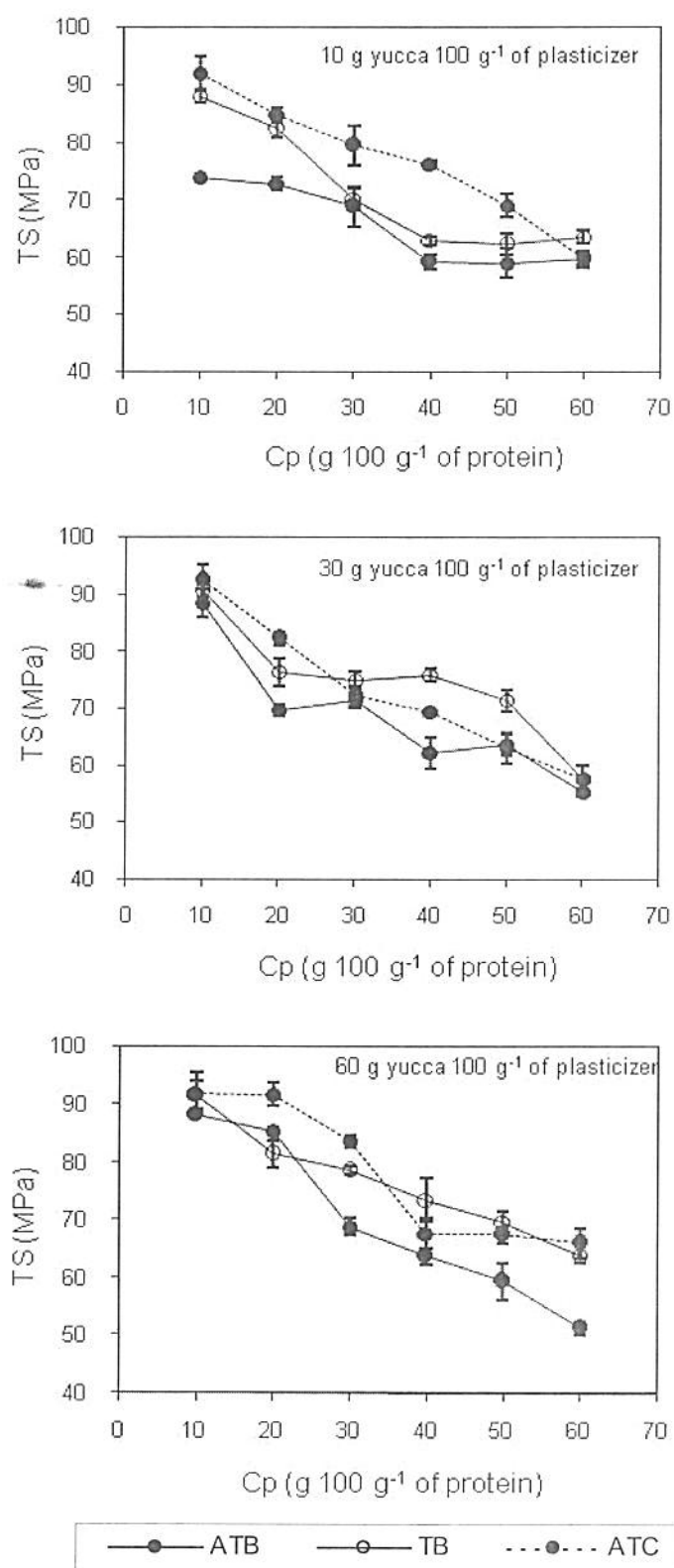


Fig. 1. Effect of the plasticizers concentrations (C_p) and yucca concentrations on tensile strength (TS) of based gelatin films.

The elongation values (%E) increased with increasing amounts of plasticizer up to 50 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin, decreasing after this value independent of the surfactant concentration used. Maximum values for %E were obtained with 50 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin associated with the lowest quantity of surfactant (10 g yucca 100 g⁻¹ of plasticizer), reaching values of 12.4%; 12.5% and 10.6% for ATB, TB and ATC respectively and minimum values ranging from 4.0% to 5.5% for 10 g plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin. Although an increase in the %E values was observed, the values were much lower than those obtained when gelatin and glycerol were used in the production of films by casting, where %E values ranging from 98% (Thomazine et al., 2005) to 127% were obtained (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, & Tanaka, 2006), indicating that the incorporation of the hydrophobic plasticizers studied was not sufficient to increase the free volume between the protein chains and allow them greater mobility, thus increasing the extensibility of the resulting films (Sothornvit & Krochta, 2001).

3.2 Water vapor permeability

The water vapor permeability (WVP) values of the films varied between 0.34 and 0.12 (g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹) for the different types and quantities of plasticizer studied (10-60 g 100 g⁻¹ of protein) when 10 and 30 g of yucca 100 g⁻¹ of plasticizer were used. Although these are low values for biofilms, a direct correlation between the increase in plasticizer/surfactant and a consequent decrease in water vapor permeability was not observed. However, when the amount of yucca was increased to 60 g 100 g⁻¹ of plasticizer, the correlation was seen for all three plasticizers studied (ATB, TB and ATC), with a decrease in the water vapor permeability with increasing plasticizer concentration from 10

to 50 g plasticizer 100 g⁻¹ of protein (Fig. 2). Maintaining the same amount of surfactant (60 g 100 g⁻¹ of plasticizer), an increase in water vapor permeability was observed when 60 g plasticizer 100 g⁻¹ of protein was evaluated, indicating an excess of plasticizer as a possible interference in the best structural arrangement of the filmogenic matrix, and a consequent increase in WVP. Decreases in the WVP of gelatin films emulsified by high pressure homogenization were obtained when high pH values and larger amounts of corn oil were used in the film formulation, and this effect was explained by the formation of an interconnecting lipid network within the film matrix, decreasing the film free volume (Wang, Auty, Rau, Kerry, & Kerry, 2009).

The behavior observed for WVP was different when lecithin and the same plasticizers were evaluated, the lowest WVP also being obtained with 60 g surfactant 100 g⁻¹ of plasticizer, but with the smallest amounts of ATB or TB used, 10 g plasticizer 100 g⁻¹ of protein (Andreucetti et al., 2009). Although yucca and lecithin exhibit surfactant characteristics, the effect observed may be related to differences between the yucca and lecithin with respect to hydrophobicity and water solubility, producing different intensities of association with the protein matrix and the plasticizer, promoting different levels of plasticizer/surfactant accommodation in the filmogenic matrix.

The minimum values obtained for WVP when 60 g yucca 100 g⁻¹ of plasticizer and 50 g of plasticizer 100 g⁻¹ of protein were used were 0.08, 0.07 and 0.06 g mm⁻² h⁻¹ kPa⁻¹, with no significant differences ($p > 0.05$), for ATB, TB and ATC respectively. The presence of sugars in the yucca molecule may have promoted an association with the protein polar groups by way of hydrogen bonds, thereby reducing the possibility of the water molecules associating with the available polar groups, contributing to a reduction in the WVP as recently suggested in the hypothesis for the biofilms produced with other types

of colloid containing surfactants (Chen et al., 2009; Villalobos et al., 2006). The lowest WVP values obtained represented an average decrease of 55-60% when compared with the lowest values obtained for WVP when lecithin, ATB and TB were used in the production of emulsified gelatin films (Andreucetti et al., 2009), also being inferior to those obtained for films with different emulsified hydrocolloids (Fabra, Talens, & Chiralt, 2008; Morillon et al., 2002). The incorporation of the hydrophobic plasticizers associated with the use of yucca as a surfactant promoted WVP values comparable to or lower than the permeability values obtained for films containing glycols as hydrophilic plasticizers (Gómez-Estaca, Montero, Fernández-Martín, & Gómez-Guillén, 2009; Jongjareonrak et al., 2006; Thomazine et al., 2005).

Recently, films produced with tapioca starch/hsian-tao leaf gum added together with sucrose esters (S-1170, HLB = 11) and glycerol as plasticizer, presented WVP values of the same order, and inferior to those obtained in the present study, reaching a minimum value of $0.04 \text{ (g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}\text{)}$ when high concentrations of surfactant (25% w/w) were used (Chen et al., 2009). The authors also used other sucrose esters with different HLB, observing that an increase in the HLB value produced decreases in the WVP and tensile strength of the films, suggesting that the decrease in WVP was a consequence of hydrogen bond interactions between the hydrocolloids and the polar groups of the surfactant, thereby reducing the number of polar groups available to interact with water molecules. However, negative effects on the WVP and mechanical properties were observed with the addition of the emulsifiers (Tween 60, Tween 80 and glycerol monostearate) to soybean oil films (Bravin et al., 2004).

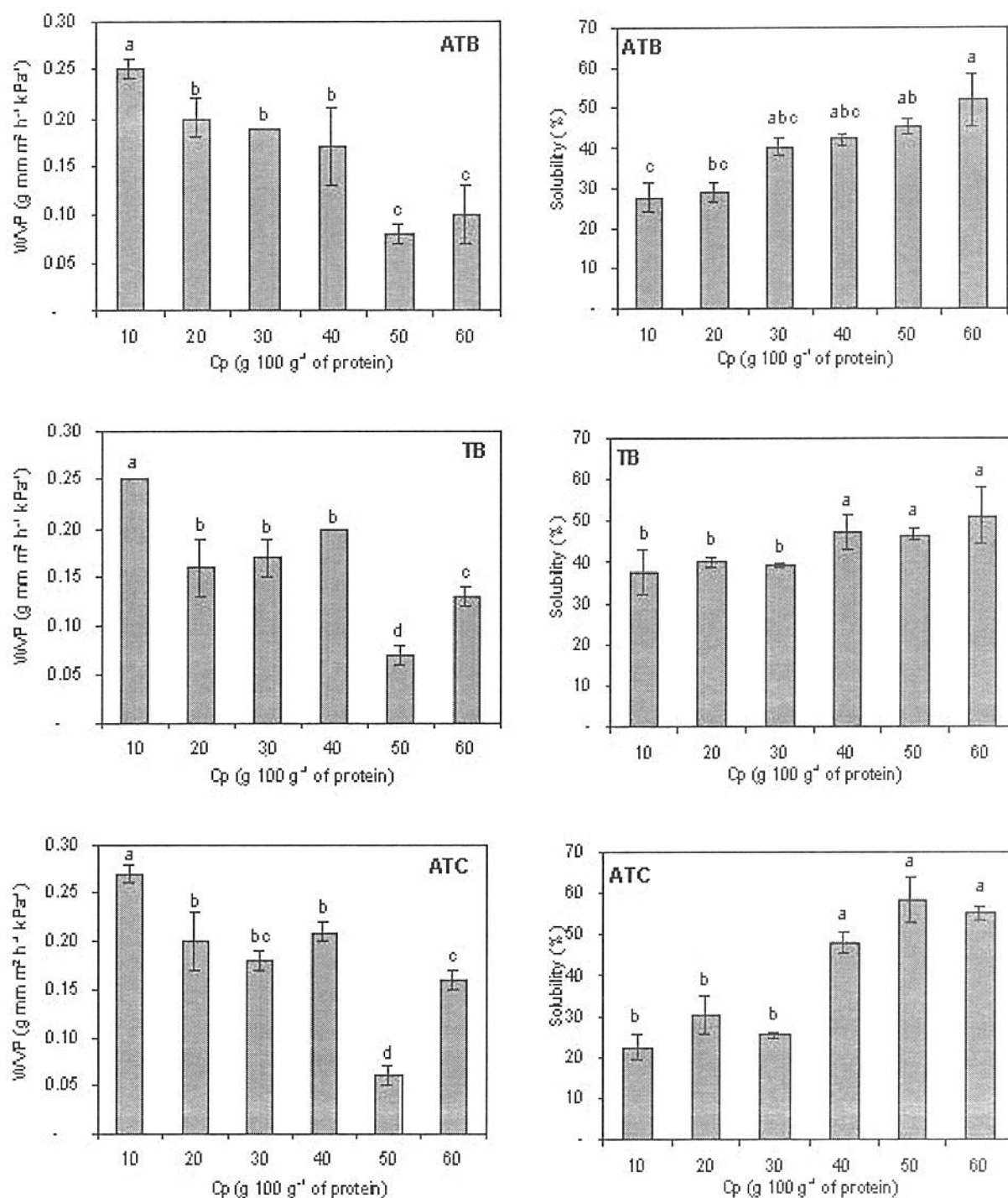


Fig. 2. Effect of the plasticizers concentrations (C_p) on water vapor permeability (WVP) and solubility in films-based gelatin for 60 g of yucca 100 g⁻¹ of plasticizer. ^{a,b} Different letters represent significant differences ($p \leq 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

3.3 Water solubility

Gelatin-based films and those with added hydrophobic plasticizers and surfactant yucca presented values for water solubility ranging from 24.7% to 52.1% for ATB, from 30.7% to 51.1% for TB and from 21.1% to 59.5% for ATC, for the various formulations studied. An increase in the solubility with the higher concentrations of plasticizer was observed when the largest amount of yucca (60 g 100 g⁻¹ of plasticizer) was used (Fig. 2). The addition of hydrophobic compounds to the protein matrix should have produced films with lower solubility, but this was not observed with increases in the concentration of the hydrophobic plasticizer. An increase in solubility due to the incorporation of hydrophobic substances was also observed for the gelatin-based films, “Brazilian elemi”, stearic and palmitic acids and triacetin (Bertan, Tanada-Palmu, Siani, & Grosso, 2005), and for gluten based films with added lipids (Gontard et al., 1994). These authors stated that large amounts of hydrophobic substances in the protein matrix led to a partial destabilization of the protein structure, reducing intermolecular interactions between the protein chains and allowing for greater solubility of the films obtained.

3.4 Opacity

The films obtained were opaque due to the incorporation of hydrophobic compounds into the filmogenic matrix, noting that, regardless of the type of plasticizer used, the higher the plasticizer concentration, the greater the opacity, with opacity values ranging from 14% to 30% for films made with ATB and TB and from 13% to 20% for films with ATC. A similar behavioral pattern was observed for gluten films containing fatty acids (Gontard et

al., 1994; Yang & Paulson, 2000) and gelatin films with added hydrophobic compounds (Bertan et al., 2005). Films with higher concentrations of surfactant also produced an increase in opacity.

3.5 Size of the emulsion droplets and film morphology

The emulsion droplets observed in the filmogenic emulsion immediately after production, presented a spherical shape, unimodal distribution and polydispersion with respect to droplet size. The average sizes and the WVP of the corresponding films were determined for the emulsions with no added yucca and for the formulations containing surfactant that produced films with lower WVP values (Table 1). The sizes obtained were comparable to the values found in the literature, where the average size of the emulsion droplets ranged from 0.9 to 2.0 μm for films obtained from whey protein isolate emulsified with a mixture of fatty acids (McHugh & Krochta, 1994), from 0.51 to 2.28 μm for emulsified whey and beeswax films (Pérez-Gago & Krochta, 2001) and from 5 to 22 μm for maltodextrin with a mixture of sorbitan monostearate and a polyoxyethylene derivative of sorbitan monooleate (Díaz-Sobac & Beristain, 2001).

The addition of yucca to the formulations caused a reduction in the size of the emulsion droplets when the plasticizers ATB and TB were used, and also a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the WVP values obtained (Table 1). The emulsions formed from the filmogenic solutions presented good stability with no phase separation (exudation) after drying. As the size of the droplets decreased, the emulsions obtained became more stable and their distribution more homogeneous, producing a decrease in the WVP value (McHugh & Krochta, 1994; Pérez-Gago & Krochta, 2001). However, the emulsion containing yucca

and the plasticizer ATC, although it produced the lowest value for WVP of the plasticizers studied (Table 1), showed a low increase in the average size after inclusion of the surfactant. However the lower WVP values obtained for films containing ATB, TB and ATC did not show significant differences. The correlation between lipid particle size and WVP is attributed to immobilization of the protein chain at the interface of the hydrophobic compounds, resulting in the formation of more ordered cross structures, providing lower permeability to water vapor (McHugh & Krochta, 1994). However, in a study with iota-carrageenan based emulsified films, no significant relationship between particle size and the water vapor barrier proprieties was observed (Karbowski, Debeaufort, & Voilley, 2007). These authors stated that one cannot improve the water vapor barrier efficiency of the films by simply adding hydrophobic compounds to the formulation, unless a homogeneous and continuous lipid layer is formed in or on the hydrocolloid matrix. In emulsified films, the vapor water molecules migrate mainly through the continuous hydrophilic matrix, and the dispersive lipid phase only modifies the "apparent tortuosity" of the matrix (Debeaufort, Martín-Polo, & Voilley, 1993).

The images obtained by CLSM (Fig. 3) for the films showing lower WVP with each of the plasticizers studied reinforced the results of the effect of adding surfactant on the size of the emulsion droplet, as presented in Table 1. One can observe size differences and greater homogeneity in the distribution of the emulsion droplets in the filmogenic matrix of films containing surfactant (Fig. 3, ATB, TB and ATC, right side) as compared to the emulsion droplet distribution in the absence of the surfactant (Fig. 3, ATB, TB and ATC, left side) in the films after drying. Although a better distribution is observed after the addition of the surfactant, it is clear that the incorporation does not occur in a completely homogeneous manner and the presence of emulsion droplets can be observed, even after the possible

improvement due to the incorporation of hydrophobic compounds into the hydrophilic protein matrix, and the consequent decrease in the WVP value. A homogeneous incorporation of these plasticizers when lecithin was used as the surfactant was previously observed (Andreuccetti et al., 2009). Besides the homogeneous distribution of the hydrophobic plasticizers within the film, another important factor is maintaining the emulsion stability during drying, where the emulsifier should stabilize the dispersed lipid droplets (Bravin et al., 2004).

Table 1. The mean diameters of emulsion droplets (d_m) obtained from filmogenic solutions containing gelatin and hydrophobic plasticizers (ATB, TB and ATC) with and without the presence of yucca (C_Y).

<i>Plasticizer</i>	C_Y (g 100 g ⁻¹ of plasticizer)	d_m (μm) ^A	<i>WVP</i> (g mm m ⁻² h ⁻¹ kPa ⁻¹) ^A
ATB	0	4.31 ± 1.83 ^a	0.28 ± 0.02 ^b
	60	1.84 ± 0.59 ^d	0.08 ± 0.01 ^c
TB	0	3.43 ± 1.50 ^b	0.60 ± 0.04 ^a
	60	1.91 ± 0.61 ^d	0.07 ± 0.01 ^c
ATC	0	2.69 ± 0.95 ^c	nd ^B
	60	3.49 ± 0.92 ^b	0.06 ± 0.01 ^c

Note: ^AAverage ± standard deviation. Different letters represent significant differences ($p \leq 0.05$) between the averages obtained in the Tukey test.

^Bnd: Value not determined due to the impossibility of removing the film from the acrylic support.

Although, after drying, the films presented a visually homogeneous aspect with a continuous surface and the absence of pores, the SEM micrographs (Fig. 4, left side, surface and right side, cross-section structure) showed that the films were heterogeneous with dried emulsion droplets on the surface and the presence of pores within the internal structure, independent of which plasticizer was used, with a low degree of compact

arrangement. Similar results were obtained with films produced from methylcellulose and cocoa butter, showing lower WVP when Tween 80 was used as the emulsifier as compared to glycerol monoesterate or Tween 60, with a compact structure but a non-homogeneous fat distribution inside the film, as observed by scanning electron microscopy (Bravin et al., 2004). Opposite results showing homogeneous incorporation and a high degree of compactation were observed by SEM for the films containing ATB and TB with lecithin as the surfactant, as previously presented (Andreuccetti et al., 2009). A comparison of the internal morphologies (Fig. 4, right side) indicated that the film containing ATB had a greater presence of pores, resembling a sponge, as compared to the films containing TB and ATC. The formation of dried globules was visible on the surface of the films (Fig. 4), producing disruption of the protein matrix, increasing internal heterogeneity and giving the surface of the material a more rough and irregular aspect (Villalobos et al., 2005). Evaporation of the solvent during the drying process of the emulsified film solution can induce alterations in the structure of the emulsion, which can cause a destabilization of the structure, including the flocculation and coalescence of hydrophobic globules (Fabra, Talens, & Chiralt, 2009). These authors studied sodium caseinate films with added fatty acid and beeswax, observing the formation of a laminated structure in the transversal section due to the addition of the fatty acids. This may be associated with the molecular aggregation of lipid molecules during the drying period of the film, contributing to the reduction in the WVP.

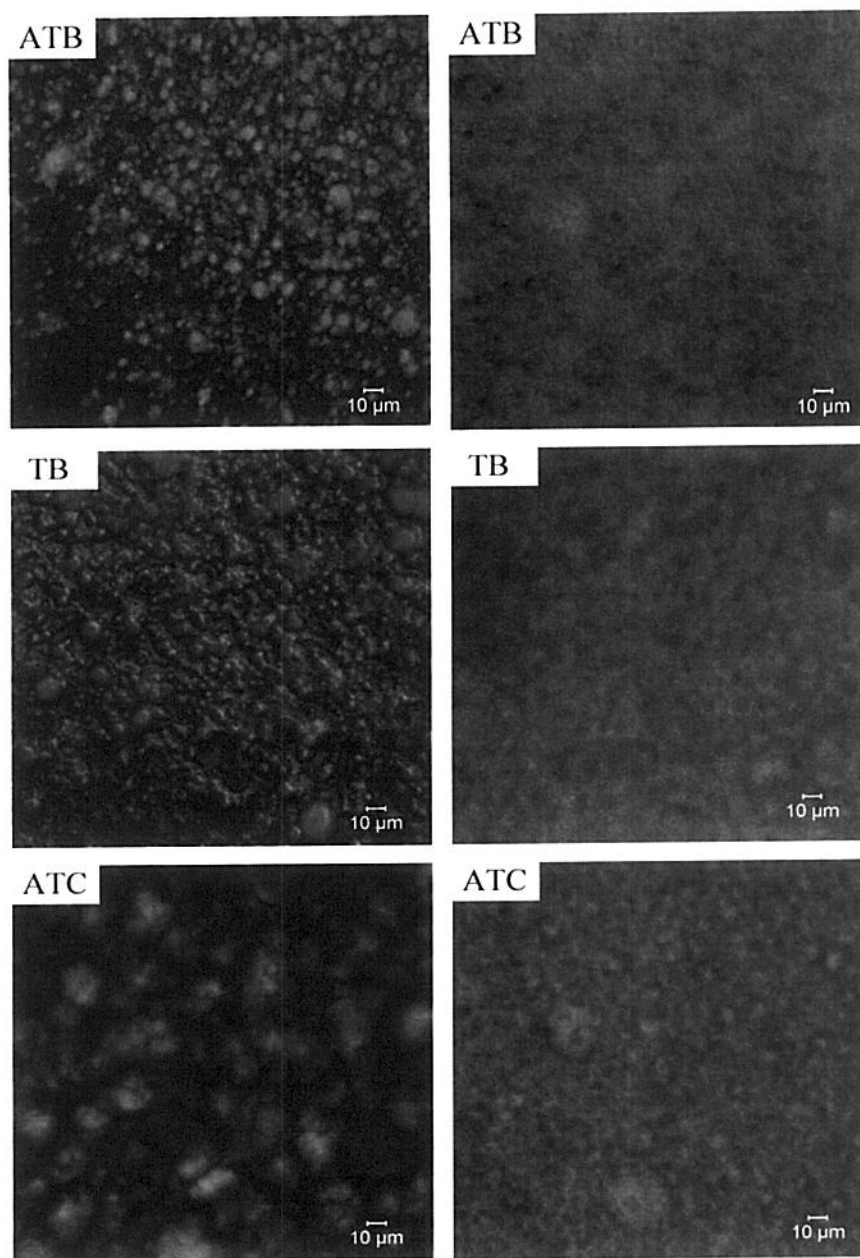


Fig. 3. Micrographs using merge mode, obtained by CLSM of gelatin films without (left column) and with (right column) yucca (gelatin + FITC and plasticizers and yucca + Nile Red). Concentration of plasticizer: 50 g 100 g⁻¹ of gelatin and concentration of yucca: 60 g 100 g⁻¹ of plasticizer, (bars = 10 µm).

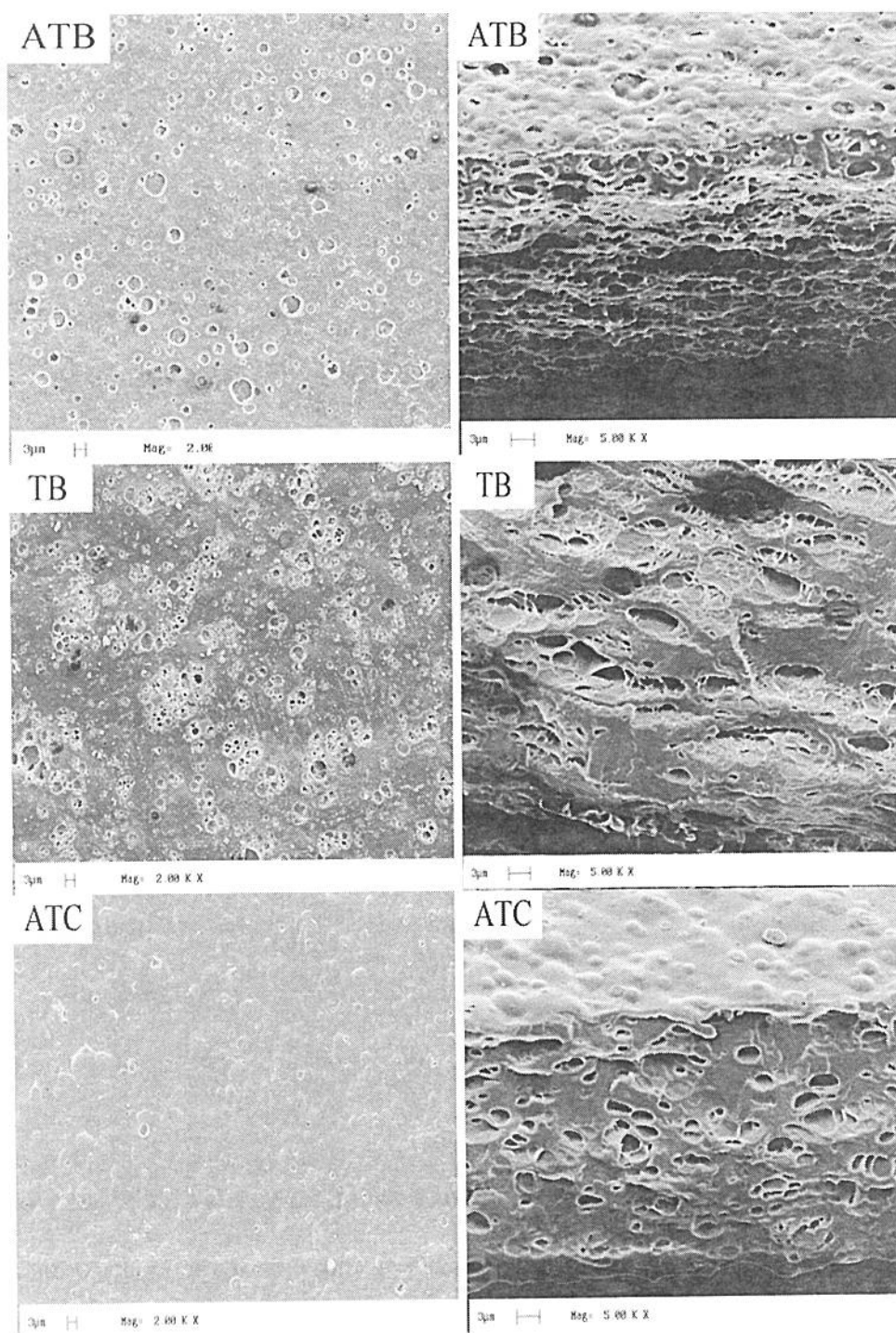


Fig. 4. Micrographs by SEM (bars = 3μm) of surface (left column) and internal structure (right column) of gelatin films with hydrophobic plasticizers and yucca. Concentration of plasticizer: 50 g 100 g⁻¹ of gelatin and concentration of yucca: 60 g 100 g⁻¹ of plasticizer.

3.7 Infrared Spectroscopy

Infrared spectra of the gelatin-based films plasticized with TB, ATB or ATC using yucca as the surfactant, as well as the individual plasticizers, gelatin and yucca, can be observed in Fig. 5.

As citric acid derivatives (Labrecque et al., 1997), pure TB, ATB and ATC spectra showed a characteristic common absorption band corresponding to the ester carboxylic group at around 1750 cm^{-1} (Fig. 5). The region between $1300\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ (C-CO-O and O-C-C axial deformation) was also similar for the three plasticizers, especially in the case of the fully esterified molecules of ATB and ATC. The free tertiary hydroxyl group appeared as a weak broad band at 3490 cm^{-1} in TB.

The broad peaks between $3600\text{ and }3000\text{ cm}^{-1}$ in the spectra of the single gelatin film or yucca were indicative of the alcoholic groups, represented by the hydroxyl or amino compounds present in the gelatin and the saponin glucosyl moieties, respectively. Yucca is also known to contain other hydroxyl compounds such as resveratrol and yuaccaols (Piacente, Montoro, Oleszek, & Pizza, 2004), which may account for the enhancing signals in the O-H absorbing region.

The IR profiles of the gelatin films formulated with the hydrophobic plasticizers ATB, TB or ATC by adding yucca saponin as the surfactant, merely corresponded to the addition of all the original signals present in the individual spectra in each case. As can be seen in Fig. 5, the same diagnostic absorptions for the pure plasticizers, pure yucca and plain gelatin film were strictly maintained in the films produced there from, suggesting that no strong chemical interactions had taken place during the film preparation. This fact is also suggested by the images obtained by SEM (Fig. 4) and CLSM (Fig. 3), where one can

observe that the compounds added were dispersed in a non-homogeneous manner in the protein matrix.

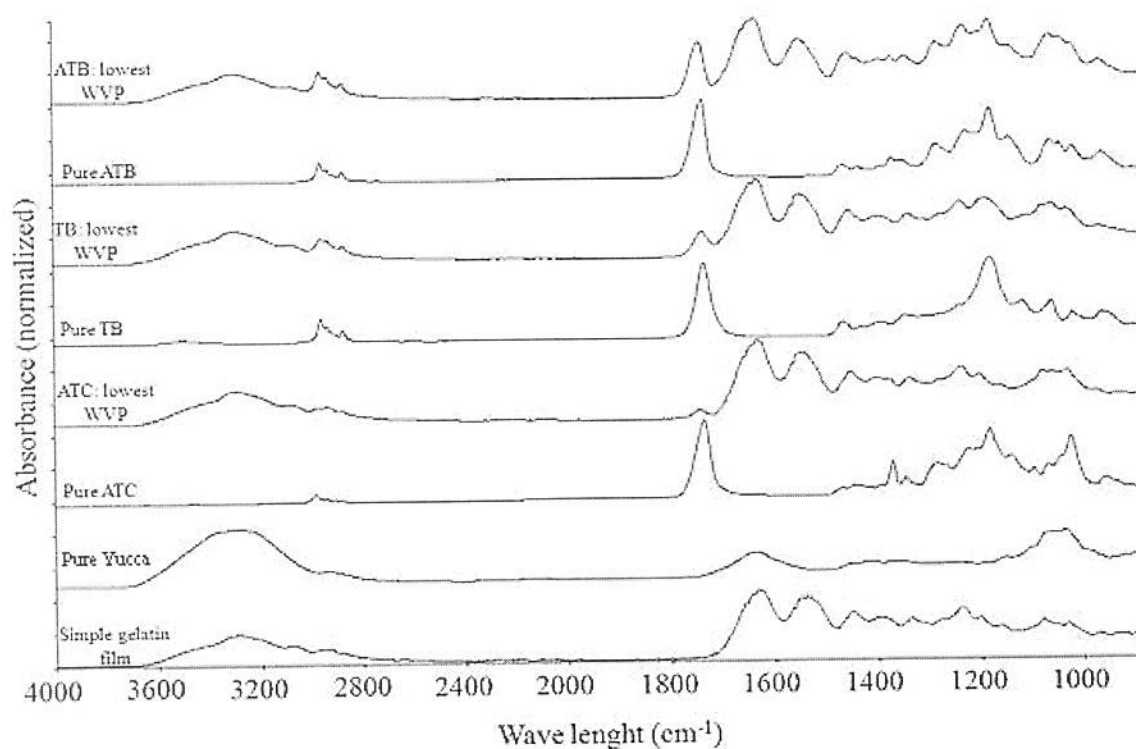


Fig. 5. FTIR spectrum of gelatin films containing hydrophobic plasticizers and yuca. Condition of lowest WVP for ATB, TB and ATC: 50 g of plasticizer 100 g⁻¹ of gelatin plus 60 g of yucca 100 g⁻¹ of plasticizer.

4. Conclusions

Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers (ATB, TB and ATC) and the saponin extracted from *Y. schidigera* (yuca) as surfactant, showed good mechanical resistance (TS), low values of water vapor permeability and reduced drying times. However the films presented limited elongation, considerable solubility and opacity. Although in the visual analysis the films were homogeneous with no porosity, when observed at a

microscopic level (SEM) they showed roughness with the presence of pores inside the cross-section. The possibility of using a natural surfactant such as yucca may allow for new applications such as those presented in this study and should be thoroughly investigated.

Acknowledgments

The authors are grateful to *Gelita do Brasil Ltda* (gelatin), *Morflex, Inc.* (plasticizers) and *Beraca Sabará Químicos e Ingredientes Ltda* (yucca) and especially to Dra. Suziley Ciampone for her suggestions regarding uses for yucca. They are also grateful to FAPESP (process n° 2006/00431-8).

References

- Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2009). Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International*, 42, 1113-1121.
- ASTM D 882-95. (1995a). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM E 96-95. (1995b). *Standard test methods for water vapor transmission of materials*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 523. (1999). *Standard test method for specular gloss*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Banker, G. S. (1966). Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science*,

55, 81-89.

Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19, 73-82.

Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2004). Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52, 6448-6455.

Carvalho, R. A., Sobral, P. J. A., Thomazine, M., Habitante, A. M. Q. B, Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22, 1117-1123.

Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.-S. (2009). Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in. *Food Hydrocolloids*, 23, 714-721.

Debeaufort, F., Martín-Polo, M., & Voilley, A. (1993). Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible film. *Journal of Food Science*, 58, 426-429.

Debeaufort, F., & Voilley, A. (1995). Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 183-190.

Díaz-Sobac, R., & Beristain, C. I. (2001). Water vapor permeability of an emulsion coating of maltodextrin and surfactants. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25, 25-34.

Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor

- permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.
- Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23, 676-683.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90, 480-486.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39-50.
- Güçlü-Üstündag, O., & Mazza, G. (2007). Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231-258.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222, 229-235.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2007). Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 21, 879-888.
- Kristo, E., & Biliaderis, C. G. (2006). Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, 20, 1057-1071.
- Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In Gennadios, A. (Ed.), *Protein-based films and coatings* (pp.

- 1-41). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Krochta, J. M., & de Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 60-74.
- Labrecque, L. V., Kumar, R. A., Davé, V., Gross, R. A., & McCarthy, S. P. (1997). Citrate esters as plasticizer for poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 66, 1507-1513.
- Lamprecht, A., Schaffer, U. F., & Lehr, C. M. (2000). Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 1-9.
- Ljungberg, N., & Wesslén, B. (2002). The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 1227-1234.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 71, 307-312.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67-89.
- Pérez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 996-1002.
- Piacente, S., Montoro, P., Oleszek, W., & Pizza, C. (2004). *Yucca schidigera* Bark: phenolic constituents and antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, 67, 882-

885.

- Pommet, M., Redl, A., Morel, M.-H., & Guilbert, S. (2003). Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44, 115-122.
- Pugnaloni, L. A., Dickinson, E., Ettelaie, R., Mackie, A. R., & Wilde, P. J. (2004). Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging. *Advances in Colloid and Interface Science*, 107, 27-49.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39, 840-846.
- Sarnthein-Graf, C., & La Mesa, C. (2004). Association of saponins in water and water-gelatin mixtures. *Thermochimica Acta*, 418, 79-84.
- Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1113-1122.
- Thomazine, M., Carvalho, R. A., & Sobral, P. J. A. (2005). Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. *Journal of Food Science*, 70, 172-176.
- U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. 2003. Code of Federal Regulations Title 21, Volume 3 Title 21-Food and Drugs Chapter I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services Part 172-Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption.

<<http://www.cfsan.fda.gov/1rd/FCF172.html>> Accessed 15.07.2009.

- Vicentini, N. M. (2003). *Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita*. PhD thesis. Botucatu: UNESP. 198p.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández-Muñoz, P., Gutiérrez, G., & Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53-61.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., & Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-509.
- Wang, L., Zhu, W., Wang, X., Chen, X., Chen, G.-Q., & Xu, K. (2008). Processability modifications of poly(3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending, and stabilizing. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 166-173.
- Wang, L., Auty, M. A. E., Rau, A., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2009). Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of Food Engineering*, 90, 11-19.
- Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33, 571-578.

CAPÍTULO 5

“Effect of surfactants on the functional properties of gelatin edible films”

Artigo submetido para *Journal of Food Engineering*

Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films

Caroline Andreuccetti^a, Rosemary A. Carvalho^b, Tomás Galicia-García^c, Fernando Martínez-Bustos^c, Carlos R. F. Grosso^{a*}

^aDepartment of Foods and Nutrition, Faculty of Food Engineering, P.O. Box 6121, University of Campinas, UNICAMP, 13083-86, Campinas, SP, Brazil.

^bFood Engineering Department, ZEA-FZEA, P.O. Box 23, University of São Paulo, USP, 13635-900, Pirassununga, SP, Brazil.

^cCINVESTAV-Unidad Querétaro, Libramiento Norponiente 2000, Fracc. Real Juriquilla. Qro, C.P.76001, Querétaro, México.

ABSTRACT

Gelatin-based edible films, containing natural surfactants such as lecithin or yucca extract (*Yucca schidigera*), were produced and evaluated. Films containing yucca extract showed higher tensile strength values ($\sim 90 - 40$ MPa) and moisture contents ($\sim 15\%$) and less elongation ($\sim 5\%$) and WVP values ($\sim 0.22 - 0.09$ g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹) compared to films containing lecithin. Soluble films ($\sim 20 - 50\%$) were obtained when yucca extract was used, while lecithin produced low solubility films ($< 10\%$). The opacity of the films ($\sim 14.5 - 16.2\%$) was similar for both surfactants and the film surface morphologies were continuous and homogeneous. The cross sectional morphology showed that films containing yucca

* Corresponding author. Tel.: +55-19-35214079; fax: +55-19-35214060.
E-mail address: grosso@fea.unicamp.br (C.R.F. Grosso)

extract were more compact as compared to lecithin films. The FT-Infrared showed no evidence of any association between the surfactant and the gelatin, indicating that plasticization was limited, and X-Ray diffraction indicated that the addition of surfactants produced amorphous films as compared to gelatin-based films.

Keywords: gelatin-edible films, natural surfactants, lecithin, *Yucca schidigera* extract.

1. Introduction

One of the limiting factors in the application of edible and/or biodegradable films based on proteins is their reduced barrier to water vapor permeability, due to the hydrophilic property of these macromolecules and to the plasticizers (sorbitol, glycerol, ethylene glycol, polyethylene glycol, etc.) generally used in film formulations. Alternatives such as lipid addition, either in the form of an emulsion (Fabra et al., 2009; Quezada-Gallo et al., 2000; Pommet et al., 2003) or as overlapping layers (Chen et al., 2010; Debeaufort et al., 2000) have been studied.

When hydrophobic compounds are incorporated, surfactants may be necessary to stabilize or to increase the dispersion of the hydrophobic compound in the hydrophilic protein matrix, preventing them from flocculating or coalescing during film preparation and drying (Bravin et al., 2004). In addition, surfactants are amphiphilic substances that interact simultaneously with polar and hydrophobic sites on the protein, thus being able to improve the functional properties of these films (di Gioia and Guilbert, 1999). By adding a surfactant to the film formulation, the water permeability values should decrease due to the incorporation of components with some hydrophobic characteristics (Ziani et al., 2008),

which can act as a barrier and increase the distance the water vapor has to migrate through the film (Chen et al., 2009). Both ionic and non-ionic surfactants have been studied in the production of films (Bravin et al., 2004; Morillon et al., 2002; Rodríguez et al., 2006; Villalobos et al., 2006).

Of the most common natural surfactants, lecithin is widely used as an emulsifier/surfactant agent, and its efficiency as an emulsion stabilizing agent is attributed to the spontaneous agglomeration of its phospholipids at the interface between the hydrophobic and hydrophilic phases of the emulsion, with a possible liquid-crystalline organization (Shchipunov, 1996).

Other natural surfactants are the saponins, glycosides of steroids or polycyclic terpenes, whose structures include a hydrophobic chain (triterpenic or steroidal) and a hydrophilic chain (sugar chain), which decrease the surfaced tension of the water and also show detergent and emulsifying activities (Schenkel et al., 2007). *Yucca schidigera* is a plant of the Agavaceae family that grows in desert regions. It contains saponins of the steroidal type and its extract is permitted for used in the food industry (US under section 172.50, Natural Flavoring Substances and Natural Substances Used in Conjunction with Flavors, US Food and Drug Administration, 2003). Studies concerning the use of these natural surfactants in protein-based films are limited, thus the present work aims to evaluate the effects of the use of lecithin and yucca extract as natural surfactants in biodegradable and/or edible protein-based films, with respect to some of the functional properties of the films.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following materials were used to produced the films: type A pig hide gelatin (260 bloom) supplied by Gelita do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brazil); natural surfactants soy lecithin (Lécet 150M E322, lot LF 1130805T03, Caramuru, São Simão, GO, Brazil) and *Yucca schidigera* extract (Extratonina Food, lot Y-4468, Beraca Sabará Químicos e Ingredientes Ltda, São Paulo, SP, Brazil, steroidal type saponins content $\sim 10\%$, as informed by the supplier).

2.2. Preparation of biodegradable films

The films were prepared using casting techniques, with a fixed gelatin concentration of $4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of filmogenic solution. The soy lecithin and *Yucca schidigera* (yucca) extract were used at concentrations of 16, 48, 80 and $120 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of protein. The gelatin was hydrated at room temperature ($25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) for 30 min, followed by dissolution at $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The lecithin was dissolved in ethanol ($10 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of filmogenic solution) and maintained under magnetic stirring for two hours at room temperature. The yucca extract was dissolved in distilled water ($10 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of filmogenic solution) at room temperature, and then mixed manually. The gelatin solution was added to each surfactant solution and the mixtures was homogenized at 10,000 rpm for 10 min using a homogenizer (UltraTurrax IKA, T18, Werke, Germany). The homogenized mixture was vacuum-filtered to reduce the

air bubbles formed during agitation. The filmogenic solution obtained was dispersed on plexiglass plates (14 cm diameter) and kept at room temperature (25 ± 2 °C; 50 - 60% Relative Humidity, RH) to dry. The time required to dry up the films varied from 8 h, for those containing yucca extract, to 12 h, for those containing lecithin.

Preliminary tests were carried out in order to maintain the final thickness constant, amongst the different formulations studied. After drying, the films were maintained in desiccators for 7 days, before its characterization (25 ± 2 °C, $50 \pm 2\%$ RH, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$).

2.3. Film characterization, visual aspects and thickness

Visual and tactile analyses were carried out so as to use only homogeneous films with no phase separation, or exudation, the absence of insoluble particles, a uniform color, with no brittle zones, and to check which were easily removed from the acrylic supports. The films not presenting these characteristics were discarded. The film thickness was determined using a Mytutoyo Corp. digital micrometer (Tokyo, Japan) based on 10 random replicates.

2.4. Mechanical properties

The tensile strength (TS) and elongation (%E) of the films (samples with 100 x 25 mm) were determined using a model TA-XT2 texturometer (TA Instruments, Newcastle, USA) according to the ASTM D882-95 method (ASTM, 1995a), in 10 replicates. The initial

distance of separation and velocity were adjusted to 50 mm and 1 mm s⁻¹ respectively, with a 5 kg load cell.

2.5. Water vapor permeability

Water vapor permeability (WVP, g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹) was determined at 25 ± 2 °C according to the ASTM E96-95 method (ASTM, 1995b). The inside of the cells were filled with anhydrous calcium chloride (0% RH). The cells were covered with the conditioned films, sealed and placed in desiccators containing a saturated NaCl solution (75 ± 3% RH). Samples were weighed five times along 48 h and determinations were performed in triplicate. Data were recorded in a weight gain vs. time graph. The slope of the straight line, obtained by linear regression, was determined and the WVP was calculated by $WVP = \frac{w}{t A P_o (RH_1 - RH_2)}$, where ($\frac{w}{t}$) is the slope of the straight line, (x) is the average thickness of the material (mm), (A) is the permeation area (m²), (P_o) is the water vapor partial pressure at 25 °C (kPa) and ($RH_1 - RH_2$) is the gradient of relative humidity of the environment containing anhydrous calcium chloride (0% RH) and saturated NaCl solution (75% RH).

2.6. Water solubility

The solubility of the films (2 cm discs) was determined according to the methodology of Gontard et al. (1994) after 24 h of film immersion in distilled water (50 ml) with slow mechanical stirring (Shaker Marconi-MA141, Piracicaba, S.P., Brazil) at room temperature (25 ± 2 °C). Samples were then removed from the solution and dried in a forced air oven

(105 °C for 24 h). The initial mass was determined from the sample moisture content, and the difference in weight used to calculate the water soluble matter as a percentage of initial weight.

2.7. Opacity and b value*

Film opacity was determined using a Hunterlab colorimeter (Colorquest II, Reston, VA, USA). The opacity was measured according to the ASTM D 523 method (ASTM, 1999), using a D65 day light source. The determinations were performed in triplicate after calibration using standard black and white backgrounds, where opacity (Op) = (Opb / Opw) x 100, Op representing the percent opacity of the film, Opb representing the opacity of the film against a black background, and Opw representing the opacity of the film against a white background. The Hunter parameter, b* value (-b*, blueness to +b*, yellowness), was measured according to a standard test method ASTM D 1925 (ASTM, 1995c) in at least three positions randomly selected for each sample.

2.8. Scanning electron microscopy

Films were conditioned in desiccators containing silica gel (25 °C) for a period of 7 days and then fractured with liquid nitrogen. The samples were coated with gold in a sputter coater POLARON SC7620 (Ringmer, UK), 3 to 5 mA for 180 s, and morphological observations of the film surface and internal structure were performed using a scanning electron microscope LEO 440i (Cambridge, UK), at 5 kV.

2.9. Infrared spectroscopy

The Fourier transforms infrared spectroscopy (FT-IR) analyses were carried out according to the methodology described by Vicentini (2003) using a Spectrum 2000 FT-IR (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) with a Universal attenuated total reflectance (UATR) accessory, at room temperature. Films were placed in the support and pressed by the measuring sensor. Ten scans were performed for each sample in a spectral range varying from 400 to 4000 cm^{-1} and a resolution of 4 cm^{-1} .

2.10. X-ray diffraction

Samples were analyzed between a $2\theta = 3 - 55^\circ$ with a scanning speed of 2° min^{-1} in a X-ray diffractometer, D/MAX 2100 (Rigaku, Tokyo, Japan) using Co K α radiation ($\lambda = 1.543 \text{ \AA}$) at 30 kV and 30 mA. The diffractometer was equipped with a 0.5° divergence slit and a 0.6 mm receiving slit, with the beam falling on a sample area of about $7 \times 12 \text{ mm}^2$.

2.11. Experimental design and statistical analysis

The experimental design included two different surfactants and each one was studied at four different levels. For opacity, water solubility, mechanical and water vapor barrier properties, at least, three determinations were obtained for each film. Statistical analysis was carried out using SAS for Windows Version 8.0 (Cary, N.C., USA) and the differences among means were determined by using Tukey multiple tests at 95% confidence level.

3. Results and discussion

It was possible to include up to 120 g surfactant 100 g⁻¹ of protein in the preparation of emulsified films based on gelatin, for both types of surfactants studied, soy lecithin and yucca extract. Visually, films were homogeneous, with no brittle areas nor bubbles, they were easily removed from the plexiglass plate without apparent exudation of surfactant on the film surfaces and also they were easily manageable and flexible. Film emulsions were stable, with no visible phase separation after standing and easily dispersible on the plate. The thickness of the films emulsified with soy lecithin was $43.13 \pm 5.26 \mu\text{m}$ and $33.54 \pm 1.87 \mu\text{m}$ for films containing yucca extract.

3.1. Mechanical properties

As surfactant addition increased, regardless of the type used, tensile strength (TS) values reduced up to 68.6% for those films with lecithin and 46.3% for those films with yucca extract (Fig. 1A). Films prepared with yucca extract presented higher TS values compared to lecithin-containing films ($P < 0.05$), probably due to differences in hydrophobicity between the two surfactants. The addition of more hydrophobic compounds induces the development of a heterogeneous structure with areas of discontinuities and the occurrence of lower tensile strength points (Bravin et al., 2004). Similar behavior, with lower tensile strength values, was also observed for biodegradable films due to the incorporation of increasing amounts of lipids and / or surfactants (Chen et al., 2009; Ziani et al., 2008). For films prepared with potato starch, glycerol and surfactants (Tween 20,

Span 80 and lecithin), it was observed that the addition of surfactants but without plasticizer, led to slightly weaker and less flexible films, with lower TS values compared to those that contained glycerol and surfactant (Rodríguez et al., 2006).

Films produced with yucca extract presented a small variation in elongation (%E) as a result of increasing surfactant concentration (Fig. 1B) and the elongation values did not exceed 7%. Films prepared with lecithin presented higher %E values compared to those containing yucca extract. Maximum %E (21.4%) was achieved when 48 g lecithin 100 g⁻¹ of protein, was used. Lecithin addition above this amount resulted in decrease of %E, reaching 12.4% for the largest amount of lecithin used (120 g 100 g⁻¹ of protein). Surfactants are larger molecules compared to hydrophilic plasticizers (glycerol and sorbitol) generally used in biofilm production, which seems to hinder their effective inclusion within the polymer matrix. In the case of hydrophilic plasticizers its inclusion, allows greater mobility of protein chains by increasing the free volume and also, increasing the flexibility of the film formed (Chen and Lai, 2008; Ziani et al., 2008).

The elongation values obtained with lecithin and yucca extract addition to gelatin-based films were higher compared to films prepared from potato starch and surfactants (Rodríguez et al., 2006). Moreover, the inclusion of increasing amounts of corn oil in gelatin-based films increased TS and reduced elongation values (Wang et al., 2009). The hypothesis raised by these authors is that corn oil may have occupied the spaces between the protein networks of gelatin and thus limited the stretching and mobility of the chains, resulting in more resistant and less elastic films.

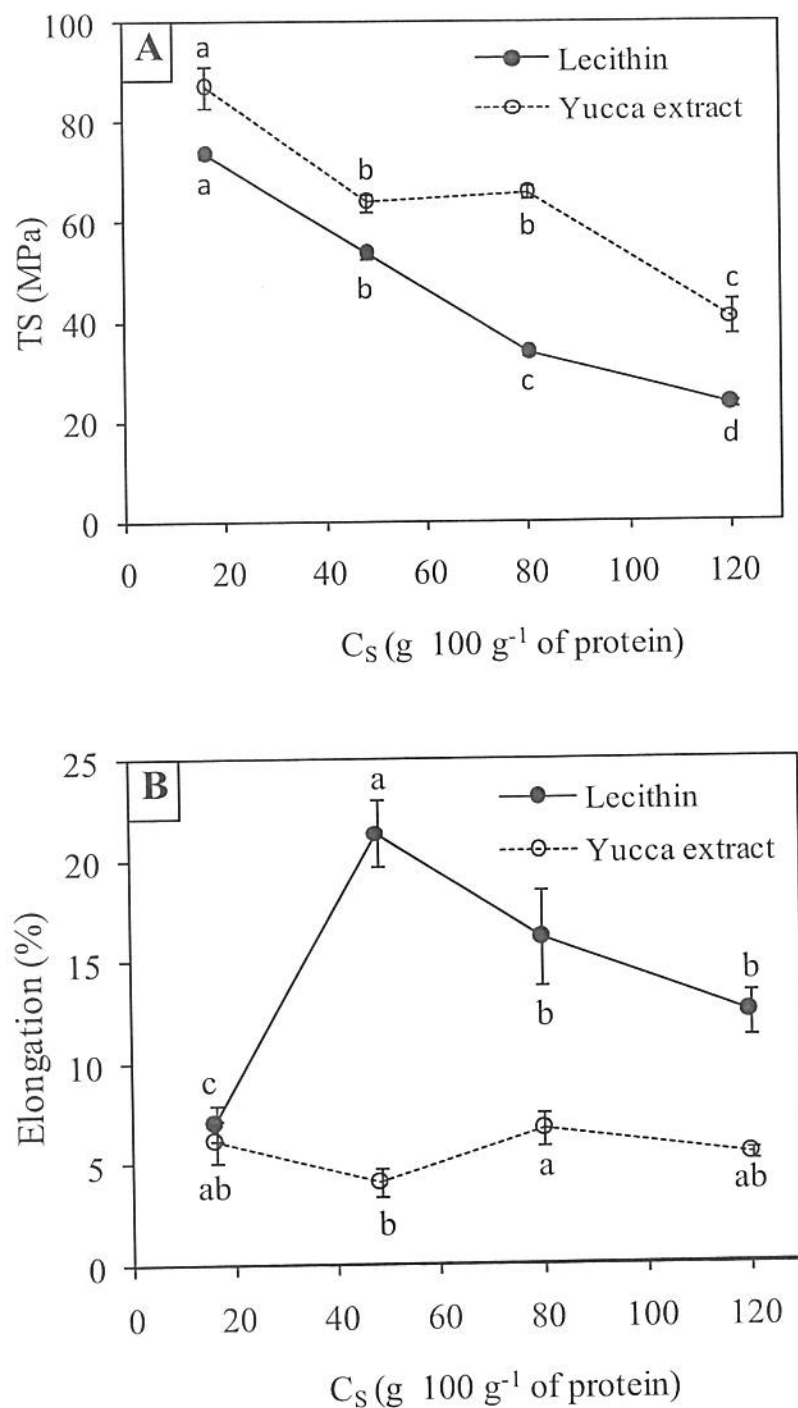


Fig. 1. Effect of surfactants concentration (C_s , lecithin or yucca) on mechanical properties of the gelatin-based films. (A) Tensile Strength (TS) and (B) Elongation. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

3.2. Moisture content and water vapor permeability

The moisture content (Fig. 2) of the films prepared with lecithin decreased as the surfactant concentration increased, due to the higher hydrophobicity of this molecule. Moisture content varied significantly ($P < 0.05$) from $\sim 20\%$ to 8.7% , as the lecithin content varied from 20 to $120 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ of protein. The different levels of yucca extract resulted in films with similar moisture contents ($P > 0.05$), with an average of 14.7% . The addition of surfactants decreased the equilibrium moisture content of films based on hydroxypropyl methylcellulose according to the polarity of the surfactant. The more polar the surfactant used, the largest moisture reduction was obtained (Villalobos et al., 2006). These authors attributed this effect to hydrogen bonds interactions between hydrocolloid and the polar groups of the surfactant, thereby reducing the number of polar groups available to interact with water molecules (Chen et al., 2009; Villalobos et al., 2006).

Adding lecithin or yucca extract to gelatin-based films produced a significant reduction in WVP (Fig. 3) compared to the gelatin-based film, which water vapor permeability was $0.53 \pm 0.03 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ (Andreuccetti et al., 2009). The increase in surfactant amount, regardless of type, caused a reduction in water vapor permeability of the films, reaching minimum values of 0.14 and $0.09 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ for those films containing higher concentrations of lecithin and yucca extract respectively. A reduction in WVP ($P < 0.05$) of $\sim 44\%$ for films containing lecithin and 57% for films containing yucca extract was observed when comparing the lowest and highest surfactant amount used. Yucca extract-containing films presented lower WVP at any concentration compared to lecithin-containing films. This effect may be due to the difference in hydrophobicity between the surfactants and the distribution thereof in the polymer matrix, which may have affected

water diffusivity in the polymer matrix. Bravin et al. (2004) working with maize starch and methylcellulose-based film observed that glycerol monostearate did not significantly affect the WVP of films, probably due to its low solubility in the hydrophilic polysaccharide phase, while Tween 80, with a more hydrophilic character and completely soluble in water, presented higher efficiency in reducing WVP.

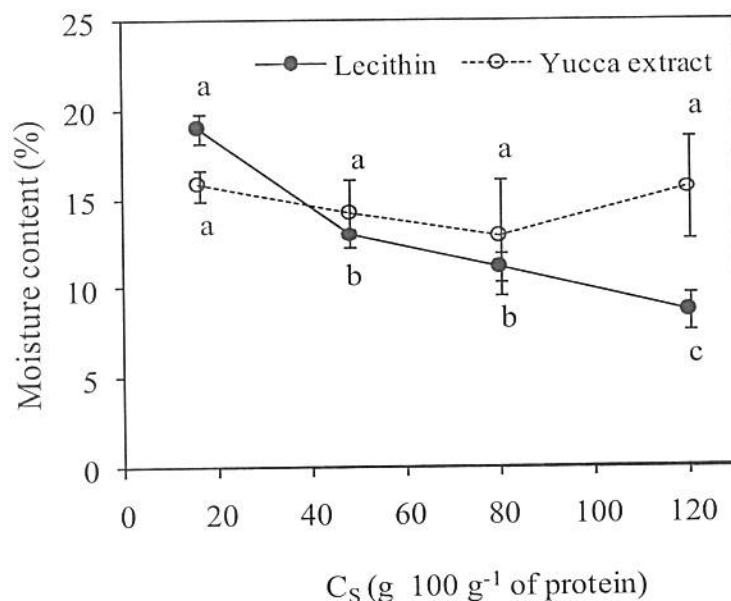


Fig. 2. Effect of surfactants concentration (C_s , lecithin or yucca) on moisture content of gelatin-based films. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

WVP values obtained in this study are similar to those observed when these same surfactants were used in combination with hydrophobic plasticizers in gelatin-based films (Andreuccetti et al., 2009) but lower than those observed by Rodríguez et al. (2006). WVP was not significantly affected in chitosan, glycerol and Tween 20-containing films (Ziani et al., 2008). Furthermore, WVP was significantly reduced when emulsified or bilayer films were produced with tapioca starch, decolorized hsian-tsao leaf gum and surfactants, which

effect is explained by hydrophilicity and structural changes of the film, according to the authors (Chen et al., 2009 and 2010).

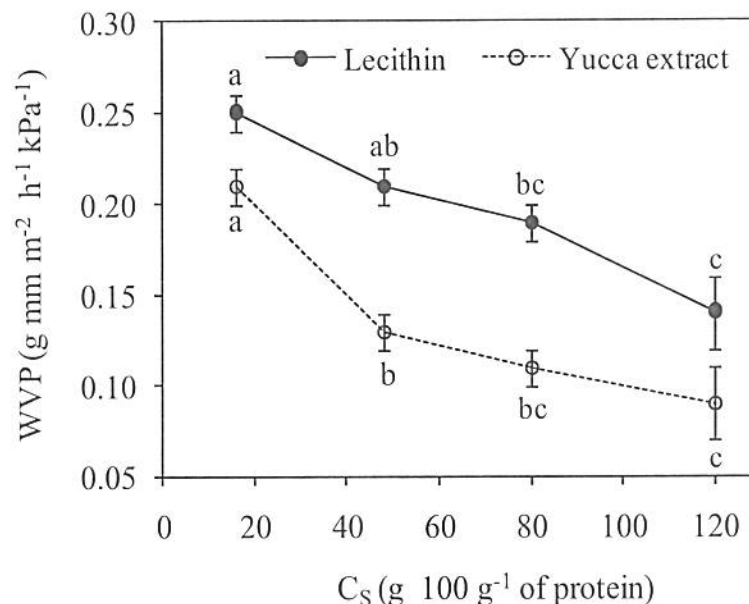


Fig. 3. Effect of surfactants concentration (C_s , lecithin or yucca) on water vapor permeability (WVP) of the gelatin-based films. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

3.3. Water solubility

Higher solubility values were observed for yucca extract-containing films compared to lecithin-containing films (Fig. 4). Maximum solubility of 51.9% was obtained with yucca extract at a concentration of 120 g yucca extract 100 g⁻¹ of protein, while values below 10% of solubility (mean 7.3%) were obtained for films containing lecithin, independent of the amount used. Yucca extract is less hydrophobic compared to lecithin due to the presence of a carbohydrate chain in its molecule, which bind water by hydrogen bonds, increasing its solubility. However, both surfactants decreased film solubility compared to pure gelatin

film, which is completely soluble in water (Carvalho and Grosso, 2004). The solubility observed for lecithin-containing films is lower than previous published results for protein films (Galiotta et al., 1997; Gómez-Estaca et al., 2009; Gontard et al., 1994).

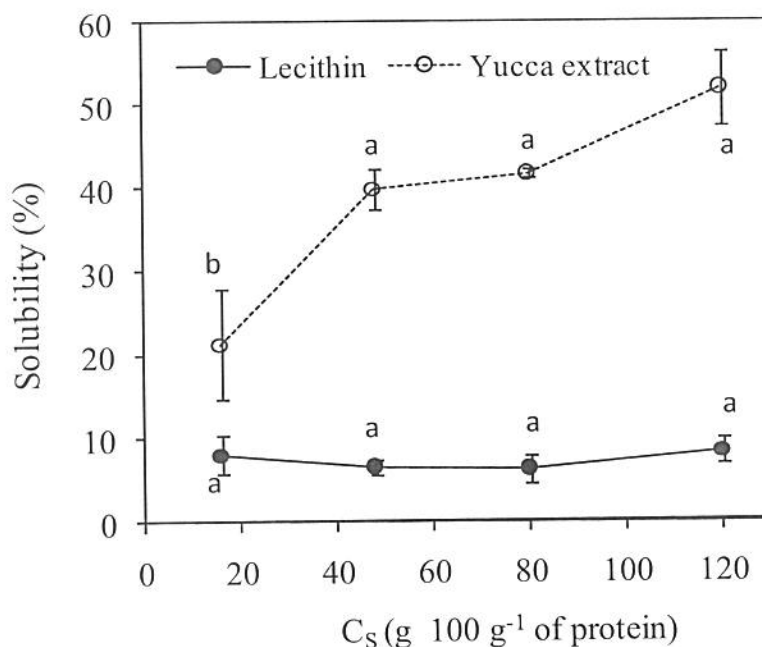


Fig. 4. Effect of surfactants concentration (C_s , lecithin or yucca) on solubility of the gelatin-based films. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test.

3.4. Opacity and b^* value

The opacity values obtained for lecithin-containing films were not significantly different ($P > 0.05$) while increasing the concentration of yucca extract significantly increases film opacity (Table 1). However, opacity values for all films were similar (15 - 16%) and slightly higher for lecithin-containing films. Increasing lecithin or yucca extract content also increases b^* values (Table 1) of the films obtained. As expected, yucca extract-

containing films presented higher b^* values ($P < 0.05$) compared to lecithin-containing films, since the yucca extract used presents a brownish color. Yellowing due to the addition of surfactant Tween 20 on chitosan-based films was observed previously (Ziani et al., 2008).

Table 1. Opacity (%) and b^* (croma b^*) of gelatin-based films containing natural surfactants (soy lecithin or yucca).

Type of surfactant	Cs (g 100 g ⁻¹ of protein)	Opacity (%) ¹	Value b^* ¹
Lecithin	16	15.99 ± 0.21 ^a	4.72 ± 0.09 ^f
	48	16.10 ± 0.28 ^a	7.21 ± 0.54 ^c
	80	16.21 ± 0.36 ^a	10.59 ± 0.87 ^d
	120	16.13 ± 0.07 ^a	13.00 ± 0.47 ^c
Yucca	16	14.53 ± 0.45 ^c	7.13 ± 0.18 ^c
	48	14.96 ± 0.12 ^{bc}	13.82 ± 0.84 ^c
	80	15.54 ± 0.45 ^{ab}	18.77 ± 0.23 ^b
	120	15.92 ± 0.03 ^b	22.03 ± 0.14 ^a

Note: ¹Average ± Standard deviation. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$) between averages obtained through the Tukey test, Cs = concentration of surfactant.

3.5. Scanning electron microscopy

The films produced with both surfactants (Fig. 5A, 5C, 5E and 5G) presented homogeneous and continuous surface, however, the morphology of yucca extract-containing films were more homogeneous, especially at the lower surfactant level (Fig. 5E) studied, probably due to a better distribution / solubilization of yucca extract in the gelatin matrix.

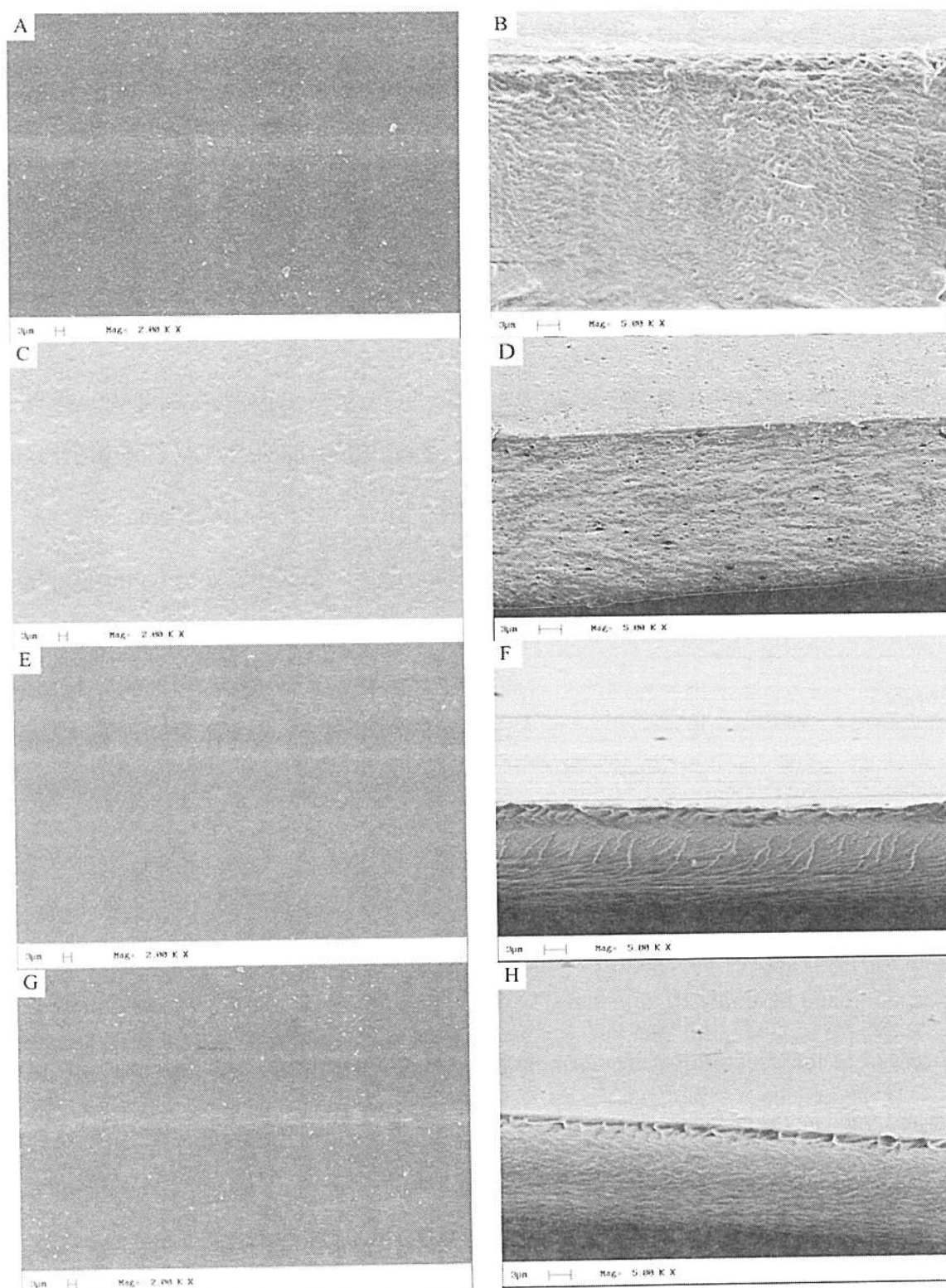


Fig. 5. SEM micrographs (bars = 3 µm) of surface (left column) and internal structure (right column) of gelatin-based films containing natural surfactants soy lecithin or yucca. (A) and (B) 16% lecithin (w/w), (C) and (D) 120% lecithin (w/w), (E) and (F) 16% yucca (w/w), (G) and (H) 120% yucca (w/w).

When the highest lecithin concentration was added to the formulation, the presence of small globules on the surface of the film was observed (Fig. 5C), indicating some heterogeneity in the protein network.

Regarding the cross section morphology, it was observed that lecithin-containing films had a less cohesive matrix and discontinuity zones (Fig. 5B and 5D) compared to yucca extract-containing films, which have a more compact matrix (Fig. 5F and 5H). This less compacted morphology may be related to the distribution and molecular aggregation of hydrophobic molecules during the drying process of the film (Fabra et al., 2009). Also, structural differences appear to be correlated to differences in WVP obtained, where the use of yucca extract, although less hydrophobic, produced films with lower WVP compared to lecithin-containing films and coincidentally more compressed regarding its internal structure.

3.6. Infrared spectroscopy

Film containing only gelatin (Fig. 6, spectrum 4) presented one characteristic peak of the absorption band of amide III, an extension of C-N and N-H group (3285.04 cm^{-1}) that is also observed in the spectrum of the formulations containing increasing concentrations of lecithin and yucca extract (Fig. 6A and 6B, spectra 1 and 2). Similar results were observed for the absorption band of amide II, responsible for extension of C-N and angular deformation of the N-H bound, which is observed in the wavelengths ranges varying from 1600 to 1500 cm^{-1} .

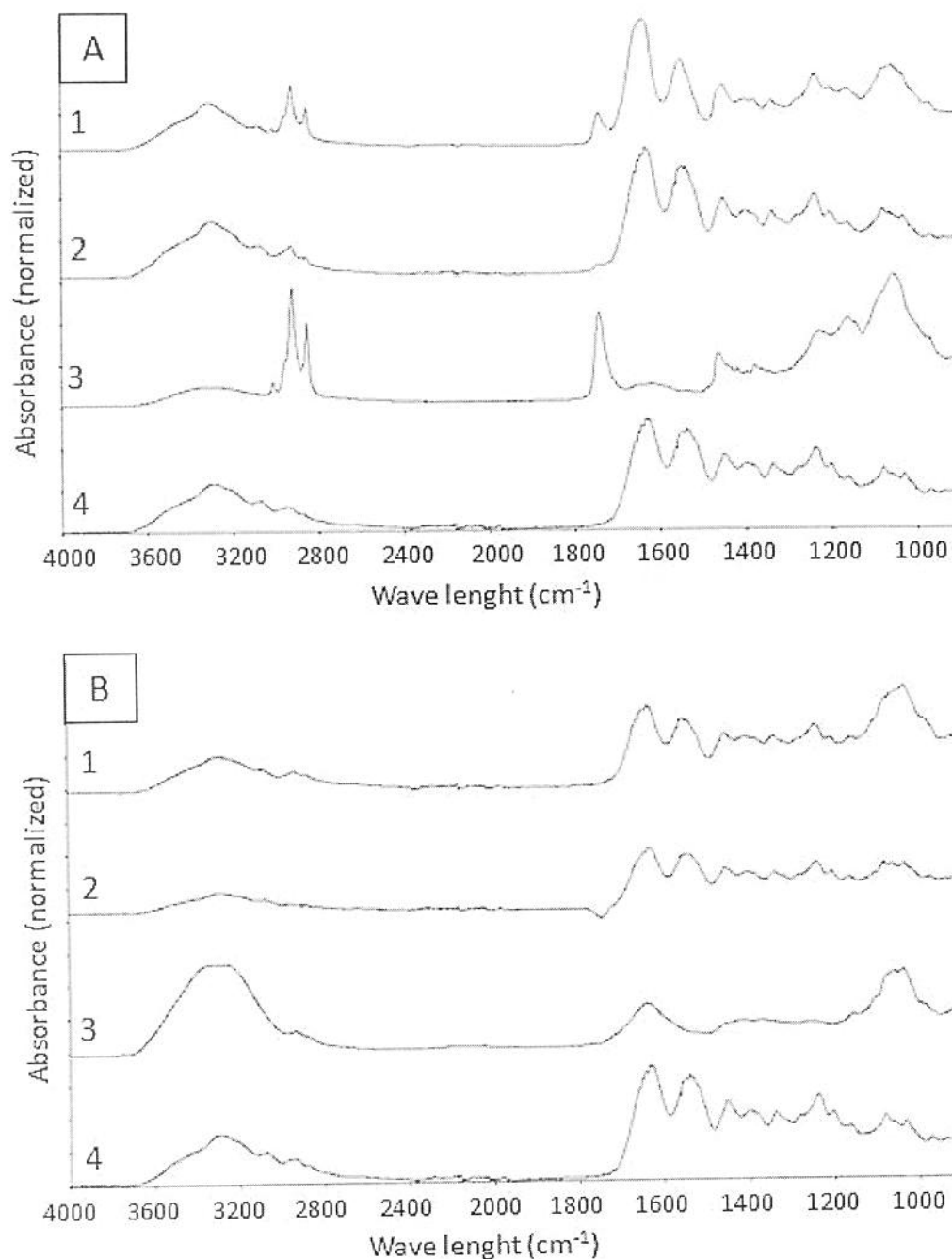


Fig. 6. FT-IR spectrum of gelatin-based films containing soy lecithin (A) and yucca (B). (1) 120 g of surfactant 100 g⁻¹ of protein; (2) 16 g of surfactant 100 g⁻¹ of protein; (3) pure soy lecithin or yucca and (4) simple gelatin-based film.

For lecithin-containing films, the characteristic peaks that represents this pure substance (Fig. 6A, spectrum 3) observed in the wavelengths ranges varying from 3700 to 2700 cm^{-1} (stretching of OH of the phosphate group) from 1400 to 1800 cm^{-1} (stretching of C = O) and 1240 - 1260 cm^{-1} (asymmetric stretching of PO_2) (Derkach et al., 2005) were also observed with films prepared with gelatin containing lecithin (Fig. 6A, spectra 1 and 2).

As observed in the spectra of lecithin-containing films, the characteristic peaks of pure yucca extract were also observed in films prepared with gelatin combined with yucca extract, being more representative for the highest amount of yucca extract used (Fig. 6B, spectrum 1), at wavelengths between 1100 - 1000 cm^{-1} .

Overall, the spectra obtained for the higher concentration of surfactants used in the film production show only an additive effect of the gelatin and the surfactants characteristic peaks with no significant new interactions between the surfactants and the protein used to produce the films. These results indicate that the surfactants appear to be simply dispersed in the protein film.

3.7. X-ray diffraction

The diffractogram obtained for the film containing only gelatin (Fig. 7) shows an partially crystalline nature, presenting a broad peak with greater intensity in the region $2\theta = 22.5^\circ$ compared to the diffraction patterns obtained for those films containing gelatin and surfactants. Similar results were observed previously by Bergo and Sobral (2007) and Cheng et al. (2003) for gelatin-containing films. Yakimets et al. (2005 and 2007) observed a characteristic peak on $2\theta = 7 - 8^\circ$ while evaluating the crystallinity of gelatin films, which is attributed to the presence of a small amount of triple-helical structure, characteristic of

the rod-like collagen triple helix.

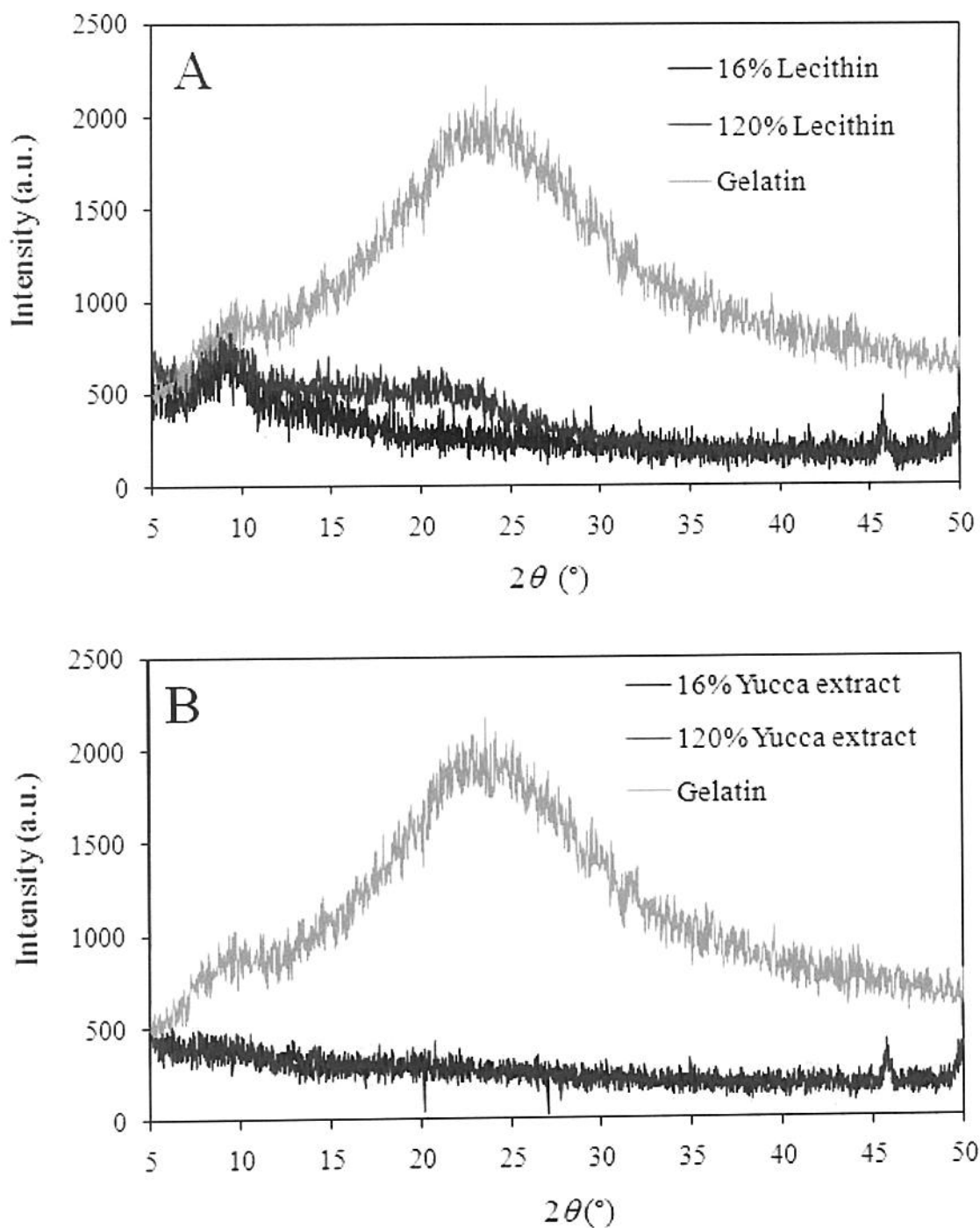


Fig. 7. X-ray diffraction of gelatin-based films as a function of (A) lecithin and (B) yucca concentration.

The surfactant inclusion to the films decreased the intensity of the characteristic peak observed in the gelatin-containing film diffractogram, indicating that the films containing gelatin and surfactants were considerably more amorphous, regardless of the type and concentration of the surfactant used. Bergo and Sobral (2007) observed a similar effect in gelatin films containing glycerol, suggesting that the amorphous character of the films was due to the lack of re-crystallization during the film production and to the high stability of the formed material or due to increased moisture in the films, preventing semi-crystalline regions to be formed.

4. Conclusions

Gelatin films containing the natural surfactants lecithin or yucca extract (*Yucca schidigera*), were visually homogeneous, with no brittle areas and no bubbles, easily removed from the plexiglass holder without any apparent surfactant exudation. Film emulsions were stable, with no visible phase separation after standing, and easily dispersed on the plate.

Yucca extract-containing films had higher tensile strength (~ 90 to 40 MPa) and moisture values ($\sim 15\%$) and lower elongation ($\sim 5\%$) and permeability to water vapor values (~ 0.22 to $0.09 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$) when compared to lecithin-containing films. Highly soluble films ($\sim 20 - 50\%$) were produced when yucca extract was used and lower soluble films ($< 10\%$) were obtained when lecithin was used. Film opacity ($\sim 14.5 - 16.2\%$) was similar for both surfactants. The surface morphology indicated continuous and homogeneous films and the cross section analysis indicated that they were more compact

when yucca extract was used. The evaluation of FT-IR spectra, which showed no strong association between surfactant and the protein used, indicated that plasticization was limited. X-Ray diffratograms indicated that surfactants addition resulted in more amorphous films compared to the gelatin-based film.

Acknowledgments

The authors are grateful to *Gelita do Brasil Ltda* (gelatin) and *Beraca Sabará Químicos e Ingredientes Ltda* (yucca extract) and to Dr. Suziley Ciampone for her suggestions regarding the uses for yucca extract. They are also grateful to FAPESP (process n° 2006/00431-8) and also to Cinvestav-Querétaro for the facilities and to M.C. Marcela Gaytán Martínez for her assistance in some analysis.

References

- Andreuccetti, C., Carvalho, R.A., Grosso, C.R.F., 2009. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International* 42, 1113-1121.
- ASTM, 1995a. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designations D 882-95. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM, 1995b. Standard test method for water vapor transmission of materials. Standard Designations E 96-95. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM, 1995c. Standard test method for yellowness index of plastics. Standard

- Designations D 1925 Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM, 1999. Standard test method for specular gloss. Standard Designations D 523 Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Bergo, P., Sobral, P.J.A., 2007. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids* 21, 1285-1289.
- Bravin, B., Peressini, D., Sensidoni, A., 2004. Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 52, 6448-6455.
- Carvalho, R.A., Grosso, C.R.F., 2004. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids* 18, 717-726.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., Lai, L.-S., 2010. Water barrier and physical properties of starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films: impact of surfactant lamination. *Food Hydrocolloids* 24, 200-207.
- Chen, C.-H., Kuo, W.-S., Lai, L.-S., 2009. Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films. *Food Hydrocolloids* 23, 714-721.
- Chen, C.-H., Lai, L.-S., 2008. Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids* 22, 1584-1595.
- Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., 2003. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 24, 2871-2880.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. ^a, Delport, B., Voilley, A., 2000. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane*

Science 180, 47-55.

Derkach, S.R., Dyakina, T.A., Levachev, S.M., 2005. Redistribution of water and gelatin between contacting liquid phases according to the IR spectroscopy data: the role of lecithin. *Colloid Journal* 67, 547-553.

di Gioia, L., Guilbert, S., 1999. Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1254-1261.

Fabra, M.J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., Chiralt, A., 2009. Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules* 10, 1500-1507.

Galietta, G., di Gioia, L., Guilbert, S., Cuq, B., 1997. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science* 81, 3123-3130.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., Gómez-Guillén, M.C., 2009. Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. *Journal of Food Engineering* 90, 480-486.

Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.-L., Guilbert, S., 1994. Edible composite films of wheat and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology* 29, 39-50.

Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., Voilley, A., 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 67-89.

Pommet, M., Redl, A., Morel, M.H., Guilbert, S., 2003. Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer* 44, 115-122.

- Quezada-Gallo, J.A., Debeaufort, F., Callegarin, F., Voilley, A., 2000. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science* 180, 37-46.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J.I., 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International* 39, 840-846.
- Schenkel, E.P., Gosmann, G., Athayde, M.L., 2007. Saponinas. In Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, UFRGS Editora, Porto Alegre, pp. 711-740.
- Scchipunov, Y. A., (1996). Phase behavior of lecithin at the oil/water interface. *Langmuir* 12, 6443-6445.
- U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. 2003. Code of Federal Regulations Title 21, Volume 3 Title 21-Food and Drugs Chapter I-Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services Part 172-Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption. <<http://www.cfsan.fda.gov/lrd/FCF172.html>> Accessed 15.07.2009.
- Vicentini, N.M., 2003. *Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita*. PhD Thesis. Botucatu: UNESP. 198p.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A., 2006. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids* 20, 502-509.
- Wang, L., Auty, M.A.E., Rau, A., Kerry, J.F., Kerry, J.P., 2009. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of Food Engineering* 90, 11-19.

Yakimets, I., Wellner, N., Smith, A.C., Wilson, R.H., Farhat, I., Mitchell, J.R., 2005.

Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state.

Polymer 46, 12577-12585.

Yakimets, I., Paes, S.S., Wellner, N., Smith, A.C., Wilson, R.H., Mitchell, J.R., 2007.

Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: a comparative study. *Biomacromolecules* 8, 1710-1722.

Ziani, K., Osés, J., Coma, V., Maté, J.I., 2008. Effect of the presence of glycerol and Tween

20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Food Science and Technology* 41, 2159-2165.

CAPÍTULO 6

**“Propriedades funcionais de filmes a base de gelatina contendo extrato de
Yucca schidigera produzidos por extrusão e *casting*”**

Propriedades funcionais de filmes a base de gelatina contendo extrato de *Yucca schidigera* produzidos por extrusão e *casting*

Caroline Andreuccetti^a, Rosemary A. Carvalho^b, Tomás Galicia-García^c, Fernando Martinez-Bustos^c, Carlos R. F. Grosso^{a*}

^a Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, C.P. 6121, Universidade de Campinas, UNICAMP, 13083-862 Campinas, SP, Brasil.

^b Departamento de Engenharia de Alimentos, ZEA-FZEA, C.P. 23, Universidade de São Paulo, USP, 13635-900 Pirassununga, SP, Brasil.

^c CINVESTAV - Unidade Querétaro, Libramiento Norponiente 2000, Fracc. Real Juriquilla, Qro, C.P.76001 Querétaro, México.

RESUMO

Filmes a base de gelatina contendo extrato de *Yucca schidigera* (yucca) e glicerol em baixas concentrações (0,25 - 8,75 g 100 g⁻¹ proteína) foram produzidos por extrusão. Os filmes resultantes foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas e teor de umidade. Formulações que resultaram em maior e menor valores de alongamento foram também utilizadas para a produção de filmes por *casting*. Os filmes extrusados (FE) que resultaram em maior e menor alongamento e os obtidos por *casting* (FC) para as mesmas formulações foram caracterizados quanto às propriedades mecânicas, teor de umidade, solubilidade, morfologia da seção transversal, difratogramas de raios-X, espectroscopia de

* Corresponding author. Tel.: +55-19-35214079; fax: +55-19-35214060.
E-mail address: grosso@fea.unicamp.br (C.R.F. Grosso)

infravermelho e temperatura de transição vítrea. O alongamento dos FE foi significativamente superior àquela obtida para os FC. A morfologia da seção transversal apresentou uma estrutura compacta e homogênea para todos os filmes estudados. A solubilidade dos filmes não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes processos (FE e FC) com valores variando de 37 a 40%. Os espectros de infravermelho não indicaram interações fortes entre os compostos adicionados. Os resultados indicaram que o processamento termoplástico de filmes a base de gelatina podem resultar em aumento significativo no alongamento, no entanto, avaliações mais específicas sobre a adição de compostos parcialmente hidrofóbicos, tais como surfactantes e otimização das condições de extrusão, são necessárias.

Palavras-chave: filmes biodegradáveis, gelatina, *Yucca schidigera*, surfactante, extrusão.

1. Introdução

Os principais problemas com relação ao uso de biofilmes estão relacionados à limitada funcionalidade, incluindo higroscopicidade, propriedades mecânicas, de barreira a gases e ao vapor de água e ao processo descontínuo amplamente utilizado para sua produção, quando comparados aos filmes produzidos com polímeros sintéticos.

Proteínas, carboidratos e lipídios são os principais compostos naturais disponíveis para a produção dos biofilmes, porém quando utilizados individualmente produzem filmes deficientes em pelo menos uma das características funcionais importantes. Como alternativa, para melhorar as propriedades funcionais dos biofilmes, esses componentes

podem ser combinados, usualmente na forma de emulsão (Pommet et al., 2003; Fabra et al., 2008; Wang et al., 2009; Chen et al., 2009) ou pela formação de multicamadas (Debeaufort et al., 2000; Kristo et al., 2007; Chen et al., 2010), ou ainda através de alterações estruturais mais intensas da rede protéica, promovidas por meio de modificações químicas, físicas e/ou enzimáticas que produzam alterações no volume livre, densidade e orientação estrutural dos filmes resultantes (Arvanitoyannis et al., 1994; Carvalho e Grosso, 2004; Galletta et al., 1998; Ghorpade et al., 1995; Rhim et al., 1999). Substâncias anfífilas, como os surfactantes, conseguem interagir simultaneamente com as porções polares e apolares da proteína, sendo capazes de melhorarem as propriedades funcionais dos filmes (di Gioia and Guilbert, 1999). Surfactantes iônicos e aniônicos, naturais ou sintéticos, tem sido estudados na produção de biofilmes (Bravin et al., 2004; Morillon et al., 2002; Rodríguez et al., 2006; Villalobos et al., 2006).

A técnica utilizada na produção de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis também pode afetar as propriedades dos mesmos. Filmes podem ser formados por um processo denominado “processo úmido” ou *casting*, que envolve a evaporação do solvente após dispersão ou solubilização dos constituintes do filme, ou pelo processo denominado “processo seco”, onde o comportamento termoplástico de proteínas e polissacarídeos associados a baixos níveis de umidade é utilizado para a formação dos filmes incluindo a moldagem por compressão, a extrusão e extrusão seguida de sopro. Estes processos produzem uma reorganização estrutural, em geral com um alinhamento molecular na direção em que o fluxo do material passa pelo extrusor (Hernández-Izquierdo & Krochta, 2008). No processamento termoplástico, a temperatura e a energia mecânica empregadas contribuem para a desnaturação mais extensiva da proteína, ao mesmo tempo em que favorece a ocorrência de ligações cruzadas, sendo uma técnica promissora para a produção

em larga escala de biofilmes quando comparada aos filmes formados por *casting*, técnica atualmente mais utilizada na produção desse tipo de material (Hernández-Izquierdo & Krochta, 2008; Liu et al., 2005, 2006; Pommet et al., 2005; Hernández-Izquierdo et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi a produção e a caracterização de filmes a base de gelatina contendo extrato de *Yucca schidigera* (yucca) usando as técnicas de extrusão e *casting*, adicionando às formulações pequenas quantidades de plastificante hidrofílico (glicerol).

2. Material e métodos

2.1. Material

Os materiais utilizados para a produção dos filmes foram: gelatina suína tipo A (260 bloom) fornecida por Gelita México (Lerma, Estado do México); extrato natural de *Yucca schidigera*, (yucca) fornecida por Agroin Baja Agroatnacional, lote UBA-028 (Baixa Califórnia, México) como surfactante, e glicerol (CAS nº 56-81-5, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).

2.2. Preparação dos filmes biodegradáveis

Os filmes foram preparados através das técnicas de extrusão e *casting*. Inicialmente foi utilizado um planejamento experimental ($2^2 + \alpha$) para avaliação do efeito da

concentração do extrato de yucca e do plastificante (glicerol) nas propriedades mecânicas e umidade dos filmes extrusados (Neto et al., 2002). Definida a melhor formulação, as propriedades dos filmes extrusados foram comparadas com as dos filmes produzidos por *casting* com a mesma formulação.

2.2.1. Processamento termoplástico

A gelatina foi misturada diretamente ao extrato de yucca e glicerol, nas quantidades previstas no delineamento experimental (Tabela 1). Água destilada foi adicionada à mistura até que essa atingisse 35% de teor de umidade. As amostras foram deixadas em repouso (5 ± 2 °C, $60 \pm 2\%$ Umidade Relativa, UR) por pelo menos 24 h para atingirem o equilíbrio antes de serem processadas no extrusor.

Para o processamento termoplástico dos filmes a base de gelatina foi utilizado um protótipo experimental de um extrusor monorosca (Cinvestav - Querétaro, México), com taxa de comprimento/diâmetro de 20:1, taxa de compressão da rosca de 13:1, e uma matriz retangular de 40 mm. O perfil de temperatura utilizado foi: zona de alimentação a 65 °C, zona intermediária (cisalhamento) a 100 °C e zona da matriz (saída) a 75 °C. As três zonas foram aquecidas, independentemente, através de aquecimento elétrico e resfriadas por ventilação forçada de ar. Foi utilizada uma taxa de alimentação constante a 18 rpm e velocidade da rosca de 47,20 rpm.

Os experimentos envolvendo a produção de filmes extrusados foram realizados de acordo com um planejamento fatorial $2^2 + \alpha$. As variáveis estudadas foram a concentração de yucca (C_Y) e a concentração de glicerol (C_G). Os ensaios foram realizados de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 1. As repostas analisadas foram: propriedades mecânicas (tensão na ruptura, TR, e alongamento, %A) e teor de umidade

(Umi). Os valores codificados e reais das variáveis independentes da matriz de planejamento experimental, relacionados com os níveis -1 e +1, podem ser observados na Tabela 1. Todos os experimentos foram conduzidos aleatoriamente. Os efeitos lineares e interações entre as variáveis (C_Y e C_G), sobre as respostas TR, %A e Umi, foram analisados através do *software* STATISTICA 5.5 (Statsoft Inc., 2000, Tulsa, EUA).

2.2.2. Casting

As formulações produzidas pelo método de *casting* (FC) foram aquelas correspondentes às formulações que resultaram no maior e menor valores de alongamento para os filmes extrusados. As relações de concentrações do surfactante e de glicerol foram mantidas de acordo com o planejamento inicial (Tabela 1).

Para a preparação da solução formadora de filme, a gelatina foi hidratada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 30 min, seguida de solubilização a 55 °C por 15 min. O extrato de yucca e o glicerol foram adicionados a água destilada ($10 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de solução filmogênica) a temperatura ambiente e homogeneizados. A gelatina solubilizada foi adicionada à solução de surfactante e plastificante e a mistura homogeneizada a 10.000 rpm por 1 min (UltraTurrax IKA, T18, Werke, Alemanha). A solução resultante foi filtrada a vácuo para redução de bolhas de ar formadas durante o processo de agitação. A solução filmogênica obtida foi dispersa sobre placas de *plexiglass* (14 cm de diâmetro) e a secagem da mesma foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C; 50 - 60% UR) por 12 horas.

2.3. Caracterização do filme, aspectos visuais e espessura

Para os FC, as análises visuais e táteis foram realizadas com o objetivo de se utilizar apenas filmes homogêneos, cor uniforme, sem separação de fases, ausência de partículas insolúveis e zonas quebradiças. Filmes que não apresentaram essas características foram descartados. Tanto para FC e FE, a espessura foi determinada utilizando-se um micrômetro digital Mytutoyo Corp. (Tóquio, Japão) com tomadas aleatórias de 10 medidas. Antes da caracterização, e após a secagem, os filmes foram mantidos em dessecadores (25 ± 2 °C, $50 \pm 2\%$ UR, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) durante 7 dias.

2.4. Propriedades mecânicas

A metodologia para a avaliação das propriedades mecânicas (TR e %A) foi diferenciada de acordo com o tipo de filme obtido pela extrusão ou por *casting*, devido a diferença na espessura observada entre os filmes. Para os FE, as propriedades mecânicas foram determinadas usando-se texturômetro modelo TA-XT2 (TA Instruments, Newcastle, EUA) de acordo com o método da ASTM D638-00 (ASTM, 2000). A distância de separação inicial e a velocidade foram ajustadas a 65 mm e 1 mm s^{-1} respectivamente, considerando amostras do tipo IV de acordo com o mesmo método, e uma célula de carga de 5 kg foi utilizada. Para os FC a TR e %A foram determinadas usando-se o texturômetro modelo TA-XT2 (TA Instruments, Newcastle, EUA) de acordo com o método da ASTM D882-95 (ASTM, 1995). A distância de separação inicial e a velocidade foram ajustadas a 50 mm e 1 mm s^{-1} respectivamente, considerando amostras (25 mm x 100 mm) e uma célula de carga de 5 kg. Para ambos (FC e FE) as propriedades mecânicas foram calculadas

como a média de 10 determinações.

2.5. Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes (discos de 2 cm) foi determinada de acordo com Gontard et al. (1994) após 24 h de imersão em água destilada (50 mL) sob agitação mecânica lenta (Shaker Marconi-MA141, São Paulo, Brasil) a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). As amostras foram removidas da solução e submetidas a secagem em estufa com circulação de ar (105 °C por 24 h) para obtenção da massa seca final. A massa inicial foi determinada a partir da umidade da amostra como porcentagem da massa seca inicial e as determinações foram feitas em triplicata.

2.6. Microscopia eletrônica de varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo sílica gel (25 ± 2 °C) por um período de 7 dias e depois foram fraturadas com nitrogênio líquido. As amostras foram recobertas com ouro em um *sputter coater* POLARON SC7620 (Ringmer, Inglaterra), 3-5 mA por 180 s, e as observações morfológicas da seção transversal dos filmes foram feitas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura LEO 440i (Cambridge, Inglaterra), a 5 kV.

2.7. Calorimetria diferencial de varredura

As temperaturas de transição vítrea (T_g) foram determinadas por análise calorimétrica de varredura utilizando-se um DSC 822e (TA Instruments, Mettler Toledo, Ohio, EUA). As amostras, da ordem de 5 mg, foram pesadas ($\pm 0,0001$ g) em uma microbalança (Boeco CE 03 0111, Alemanha) e acondicionadas em cápsulas herméticas de alumínio em dessecadores contendo sílica gel por 7 dias (25 ± 2 °C). Posteriormente as amostras foram aquecidas a 10 °C min^{-1} , entre 30 °C e 250 °C em ambiente inerte (100 mL min^{-1} de N_2) e como referência foi utilizada uma cápsula vazia. O equipamento foi previamente calibrado com *indium*. A temperatura de transição vítrea (T_g) foi calculada como o ponto de inflexão na linha base resultante da descontinuidade do calor específico da amostra utilizando-se o *software* Universal Analysis V3.9A (TA Instruments Thermal Analysis, Ohio, EUA).

2.8. Espectroscopia de infravermelho

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi conduzida de acordo com Vicentini (2003) utilizando-se um espectrômetro *Spectrum One* (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA) com sistema de reflectância total atenuada universal a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Os filmes foram colocados em um suporte e pressionados por um sensor de medição. Foram feitas dez varreduras para cada amostra em uma variação espectral de 400 - 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

2.9. Difração de raios-X

As amostras foram analisadas entre $2\theta = 3$ e $2\theta = 55^\circ$ com velocidade de varredura de 2° min^{-1} em um difratômetro de raios-X (Rigaku D/MAX 2100, Tóquio, Japão) utilizando-se filtro monocromático, radiação Cu K α ($\lambda = 1,543 \text{ \AA}$) a 30 kV e 30 mA. O difratômetro foi equipado com uma fenda divergente a $0,5^\circ$ e uma fenda receptora a $0,6 \text{ mm}$, com feixe sobre uma área amostral de $7 \times 12 \text{ mm}^2$. Foi quantificado o índice de cristalinidade relativa (I_c), de acordo com Hermans e Weidinger (1948) modificado por Rabek (1980), sendo $I_c = [A_c / (A_c + A_a)] \times 100$, com 'A $_c$ ' sendo a área da região cristalina, 'A $_a$ ' a área da região amorfa.

3. Resultados e discussão

3.1. Filmes extrusados

Visualmente os filmes extrusados mostraram-se homogêneos, com ausência de grânulos sólidos de gelatina, indicando que houve eficiente plastificação do material, tornando-o manuseável e flexível, mesmo depois de acondicionado. O protótipo de extrusor monorosca utilizado no processamento dos filmes a base de gelatina não dispunha de sistema de calandras para a adequada laminação do material extrusado e desta forma o tracionamento do material processado foi feito manualmente, obtendo-se uma média de espessura de $164,59 \pm 10,13 \text{ }\mu\text{m}$, indicativo de que houve um bom comportamento de fluidização durante a passagem pelo extrusor (Park et al., 2008). Park et al. (2008) em

filmes extrusados a base de gelatina e adicionados de glicerol, sorbitol ou mistura desses dois plastificantes, obtiveram espessuras de, respectivamente, $278 \pm 19,5 \mu\text{m}$, $1059,9 \pm 167,7 \mu\text{m}$ e $273 \pm 10,1 \mu\text{m}$, atribuindo a elevada espessura obtida para o filme contendo sorbitol à baixa fluidez do material dentro do extrusor. A espessura de filmes extrusados pode adicionalmente ser reduzida utilizando-se o método quente de prensagem após a extrusão (Park et al., 2008), uso de calandras após a saída do extrusor, ou ainda processar os filmes pela técnica do sopro tubular (Hernández-Izquierdo et al., 2008).

Os resultados obtidos em relação às propriedades mecânicas (TR e %A) e ao conteúdo de umidade (Umi) podem ser observados na Tabela 1. Os valores de TR (Tabela 1) apresentaram variação entre 19,5 e 33,8 MPa, respectivamente para as formulações 48 g extrato de yucca 100 g⁻¹ de proteína mais 8,75 g glicerol 100 g⁻¹ de proteína e 48 g extrato de yucca 100 g⁻¹ de proteína mais 0,25 g glicerol 100 g⁻¹ de proteína. Altas quantidades de extrato de yucca associadas a baixas quantidades de glicerol promoveram os mais altos valores de TR. Para a umidade os valores observados variaram de 12% a 17% (Tabela 1). Os dados de TR, %A e Umi foram submetidos a uma análise estatística ($p < 0,05$), com ajuste aos modelos linear e quadrático (Tabela 2). De acordo com a análise de variância, os modelos linear e quadrático não se ajustaram para as variáveis dependentes TR e Umi (Tabela 2), como se pode verificar em função dos reduzidos valores de R^2 . Dessa forma, as superfícies de resposta não foram geradas.

Através da análise de variância para os valores de alongamento, observou-se melhor ajuste para o modelo quadrático com R^2 de 0,74 e $F_{\text{cal}} \approx 6 F_{\text{list}}$ (Tabela 2), resultando em modelo significativo e preditivo para a variável alongamento. A superfície de resposta gerada para a resposta alongamento pode ser observada na Fig. 1, onde se verifica que concentrações mais elevadas de glicerol associadas à concentrações elevadas de extrato de

yucca resultaram em maiores valores de %A, com valores variando entre 40,2% (48% extrato de yucca e 0,25% glicerol) e 157,8% (48% extrato de yucca e 8,75% glicerol).

Tabela 1. Matriz do delineamento experimental para os filmes a base de gelatina extrusados com extrato de yucca com as variáveis reais e codificadas e as respostas do processo.

<i>Variáveis codificadas (variáveis reais)</i>		<i>Propriedades funcionais</i>		
$X_1 (C_Y)^1$	$X_2 (C_G)^1$	$TR (MPa)^3$	$A (\%)^3$	$Umi (\%)^3$
+1 (58) ²	+1 (8,0)	24,3 ± 3,7 ⁴	142,9 ± 16,7	16,9 ± 0,6
-1 (38)	-1 (1,25)	25,4 ± 0,9	75,6 ± 1,6	13,9 ± 1,7
-1 (38)	+1 (7,5)	22,8 ± 2,0	126,7 ± 3,1	15,9 ± 0,5
+1 (58)	-1 (1,5)	33,7 ± 11,7	80,9 ± 1,6	15,7 ± 0,7
0 (48)	-1,414 (0,25)	33,8 ± 6,6	40,3 ± 4,1	14,2 ± 0,2
0 (48)	+1,414 (8,75)	19,5 ± 1,4	157,8 ± 23,2	15,1 ± 1,2
+1,414 (62,14)	0 (4,75)	21,8 ± 1,1	141,0 ± 5,9	15,8 ± 0,2
-1,414 (33,86)	0 (4,0)	20,2 ± 1,6	114,2 ± 2,1	15,1 ± 0,1
0 (48)	0 (4,5)	25,2 ± 1,2	59,8 ± 0,6	16,2 ± 0,1
0 (48)	0 (4,5)	27,1 ± 5,3	124,4 ± 23,9	14,6 ± 1,4
0 (48)	0 (4,5)	20,7 ± 1,4	136,0 ± 8,9	12,8 ± 3,9

¹ $X_1 = C_Y$ = Concentração de yucca (g 100 g⁻¹ de proteína); $X_2 = C_G$ = Concentração de glicerol (g 100 g⁻¹ de proteína); ² Valor entre parêntese corresponde às variáveis reais; ³ TR: Tensão na ruptura, A: Alongamento, e Umi: Teor de umidade; ⁴ Média ± desvio padrão.

O efeito da adição de glicerol sobre as propriedades mecânicas de filmes biodegradáveis já foi bastante reportado na literatura. Quantidades crescentes desse plastificante na formulação filmogênica provocaram aumento no alongamento e redução nos valores de tensão de ruptura (Donhowe e Fennema, 1993; Cuq et al., 1997; Sothornvit e Krochta, 2001; Sobral et al., 2005; Jongjareonrak et al., 2006). Este efeito foi atribuído às

modificações na organização molecular tridimensional da gelatina, que produz diminuição das forças intermoleculares de atração entre cadeias da proteína, aumento no volume livre e maior mobilidade da cadeia polimérica (Banker, 1966).

Tabela 2. Análise de variância para o ajuste de modelos linear e quadrático aos valores de tensão na ruptura (TR), alongamento (%A) e teor de umidade (Umi).

	<i>Resposta</i>	<i>Fonte</i>	<i>SQ¹</i>	<i>GL¹</i>	<i>MQ¹</i>	<i>F_{cal}</i>	<i>F_{tab}</i>	<i>R²</i>
Modelo Linear	%A	Regressão	3339,48	1	3339,48	5,93	5,99	0,50
		Residual	3375,80	6	562,63		$F_{cal} \approx F_{tab}$	
		Total	6715,28	6	671,53			
	TR	Regressão	52,75	1	52,75	7,66	5,99	0,56
		Residual	41,36	6	6,89		$F_{cal} \approx 1,3F_{tab}$	
		Total	94,11	6	15,69			
	Umi	Regressão	4,74	1	4,74	3,67	5,99	0,46
		Residual	7,72	6	1,29		$F_{cal} \approx 0,6F_{tab}$	
		Total	12,46	6	2,08			
Modelo Quadrático	%A	Regressão	11060,02	1	11060,02	28,68	4,96	0,74
		Residual	3856,58	10	385,66		$F_{cal} \approx 6F_{tab}$	
		Total	14916,60	10	1491,66			
	TR	Regressão	171,19	1	171,19	22,94	4,96	0,69
		Residual	74,58	10	7,46		$F_{cal} \approx 5F_{tab}$	
		Total	245,77	10	24,58			
	Umi	Regressão	6,38	1	6,38	8,62	4,96	0,38
		Residual	7,35	10	0,74		$F_{cal} \approx 2F_{tab}$	
		Total	13,73	10	1,37			

¹SQ: soma quadrática, GL: graus de liberdade, MQ: média quadrática, F_{cal} : F calculado, F_{tab} : F tabelado e R^2 : $SQ_{modelo}/SQ_{residual}$.

Rodríguez et al. (2006) adicionaram surfactantes (Tween 20, Span 80 e lecitina de soja) em filmes a base de amido de batata e glicerol e observaram um efeito sinérgico entre a quantidade de glicerol e altas concentrações dos surfactantes utilizados. Esses autores observaram também que formulações contendo glicerol em presença de elevadas concentrações de surfactante resultaram em filmes com baixa tensão na ruptura e alto alongamento, comportando-se como filmes com presença de elevadas quantidades de plastificante na rede polimérica. Este aparente comportamento plástico dos filmes contendo altos níveis de surfactantes somente foi observado na presença do glicerol (Rodríguez et al., 2006).

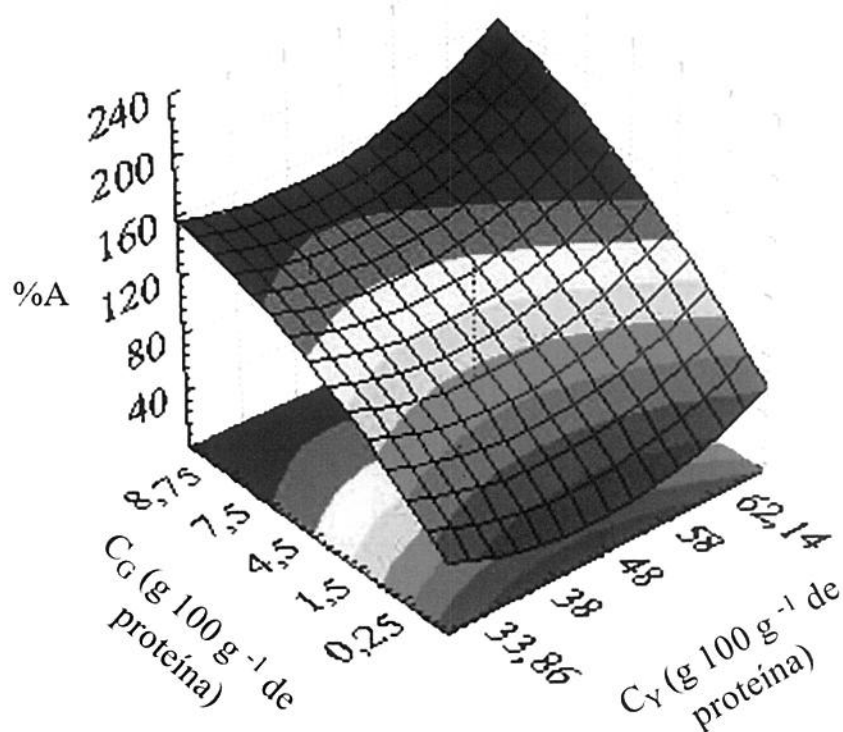


Fig. 1. Superfície de resposta para alongamento (%A): efeito das concentrações do glicerol (C_G) e do extrato de yucca (C_Y).

A partir dos resultados observados em relação às propriedades mecânicas, as formulações que produziram filmes com o maior e o menor valores de alongamento, correspondentes às formulações 48% de extrato de yucca mais 8,75% de glicerol e 48% de extrato de yucca mais 0,25% de glicerol, respectivamente, foram utilizadas para a produção de filmes por *casting* para se comparar o efeito da técnica de produção nas características dos filmes.

3.2. Filmes produzidos por extrusão e por casting

Os filmes reproduzidos por *casting* visualmente foram homogêneos, com ausência de separação de fases e de áreas quebradiças, foram facilmente retirados da placa suporte, apresentaram boa flexibilidade e boas condições de manuseabilidade, sendo a média de espessura obtida para esses filmes, de $55,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$.

3.2.1. Propriedades mecânicas

Na Tabela 3, pode-se observar que, independente da concentração de plastificante, maiores %A e menores TR foram obtidas para os filmes extrusados, atingindo ~158% e 20 MPa, enquanto nos filmes por *casting* esses valores foram de 14,5% e 44 MPa, respectivamente.

Na comparação entre filmes extrusados e elaborados por *casting*, Park et al. (2008) em filmes a base de gelatina, sorbitol e glicerol e Hernández-Izquierdo et al. (2008) em filmes de soro de leite, observaram que a tensão na ruptura foi elevada em filmes por casting, porém o maior alongamento foi obtido para os filmes extrusados. Os valores obtidos de TR e %A foram de 17 MPa e 216% para filmes extrusados e 60 MPa e 20% para

filmes obtidos por *casting* quando 20% de glicerol foi utilizado (Park et al., 2008). Enquanto que Hernández-Izquierdo et al. (2008) observaram valores médios de TR e %A da ordem de 3,5 MPa e 127% para filmes extrusados e 2,2 MPa e 57% para filmes feitos por *casting*, contendo de 45 a 55% de glicerol. Embora a quantidade de glicerol adicionada para a formação de filmes a base de gelatina e extrato de yucca no presente trabalho tenha sido inferior (0,25 a 8,75%) em relação às quantidades utilizadas pelos autores acima referidos, comportamento semelhante pôde ser observado (Tabela 3).

A diferença nas propriedades mecânicas devido aos diferentes processamentos (extrusão x *casting*) deve-se ao maior alinhamento e orientação sofridos pelas moléculas da proteína na direção do escoamento do equipamento durante o processo de extrusão, permitindo maior extensibilidade do material formado (Hernández-Izquierdo et al., 2008). Essa diferença também se deve às condições drásticas (altas temperatura e pressão) que são aplicadas ao material durante o processo de extrusão, que modificam a estrutura protéica, promovendo formação de ligações cruzadas (Ha e Padua, 2001; Paetau et al., 1994; Sothornvit et al., 2007; Hernández-Izquierdo et al., 2008). A temperatura máxima utilizada no presente trabalho foi de 100 °C na zona de cisalhamento observando-se que essa temperatura foi suficiente para permitir a formação de filmes flexíveis, com alta capacidade de manuseio, e ausência de zonas quebradiças.

O processamento termoplástico produziu filmes significativamente mais espessos que os filmes feitos por *casting* (Tabela 3). Resultado semelhante foi observado por Park et al. (2008). Para os FE a espessura aumentou com o aumento da quantidade de glicerol adicionada, resultando na redução da TR, enquanto que para FC a concentração de plastificante não induziu diferença significativa para espessura dos filmes, porém foi observado aumento na TR de acordo com o acréscimo na quantidade do plastificante

(Tabela 3). Em filmes a base de proteína do soro de leite adicionados de glicerol, processados por um extrusor dupla rosca, foi observada uma espessura média de $1310 \pm 20 \mu\text{m}$ (Hernández-Izquierdo et al., 2008). Esses autores observaram que a espessura dos filmes não foi afetada significativamente pelo conteúdo de glicerol. A espessura é um parâmetro importante que pode influenciar as propriedades funcionais dos filmes (Cuq et al., 1996). Cuq et al. (1996) e Sobral (2000) observaram em filmes feitos por *casting* a base de miofibrilas (de carne bovina e tilápia-do-nilo) que a força na perfuração aumentou linearmente devido ao aumento da espessura dos filmes. De acordo com Cuq et al. (1996) a força na perfuração é aumentada devido ao incremento da quantidade de matéria seca por superfície, e o número de cadeias de proteínas por superfície se tornaria maior, induzindo a um aumento no número de interações intermoleculares.

Tabela 3. Comparação entre as propriedades mecânicas, solubilidade e umidade de filmes a base de gelatina e extrato de yucca (concentração de $48 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína), produzidos por extrusão e por *casting*.

C_G ¹	Método	Espessura (μm)	TR (MPa) ²	A (%) ²	Sol (%) ²	Umi (%) ²
0,25	Extrusão	$167,6 \pm 22,2^b$	$33,9 \pm 6,7^b$	$40,3 \pm 4,1^b$	$37,1 \pm 0,8^a$	$14,2 \pm 0,2^a$
	Casting	$55,5 \pm 1,4^c$	$37,2 \pm 0,2^b$	$2,2 \pm 0,1^d$	$39,4 \pm 2,4^a$	$13,2 \pm 2,2^{ab}$
8,75	Extrusão	$249,3 \pm 23,7^a$	$19,5 \pm 1,4^c$	$157,8 \pm 3,2^a$	$39,8 \pm 1,6^a$	$15,1 \pm 1,2^a$
	Casting	$55,4 \pm 3,2^c$	$43,8 \pm 1,0^a$	$14,5 \pm 1,9^c$	$39,5 \pm 5,6^a$	$10,8 \pm 1,1^b$

¹ C_G : Concentração de glicerol ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína), ²TR: Tensão na ruptura, A: Alongamento, Sol: Solubilidade e Umi: teor de umidade. ^{a,b} Média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

3.2.2. Solubilidade em água

Na comparação entre filmes extrusados e feitos por *casting* (Tabela 3), tendo como base a mesma formulação, observou-se que a solubilidade desses filmes não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$), independente do método de produção utilizado. No entanto, condições drásticas de temperatura e pressão, proporcionadas pelos processos de extrusão, poderiam auxiliar na formação de ligações cruzadas durante o processamento e com isso proporcionar a formação de uma rede protéica mais forte, tornando o material formado menos solúvel (Verbeek e van den Berg, 2010).

No presente trabalho, glicerol não apresentou efeito significativo sobre a solubilidade, possivelmente devido às baixas quantidades adicionadas (0,25 a 8,75 g 100 g⁻¹ de proteína). Por outro lado, Sothornvit et al. (2003), observaram que o aumento na concentração de glicerol em filmes a base de proteína do soro de leite modelados por compressão, refletiu em aumento nos valores de solubilidade, os valores observados foram de 30; 36,1 e 49% de solubilidade para 30, 40 e 50% de glicerol, respectivamente.

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

As imagens das seções transversais obtidas a partir dos filmes cujas formulações resultaram em maior e menor valor de alongamento para filmes extrusados ou obtidos por *casting* são apresentadas na Fig. 2. As morfologias das estruturas internas dos filmes extrusados (Fig. 2A e C), independente das concentrações de plastificante utilizadas (0,25% ou 8,75%) foram homogêneas e compactas, com ausência de micro poros aparentes embora a presença de micro poros tenha sido observada anteriormente em filmes extrusados de zeína (Wang e Padua, 2003) e de gelatina (Park et al., 2008).

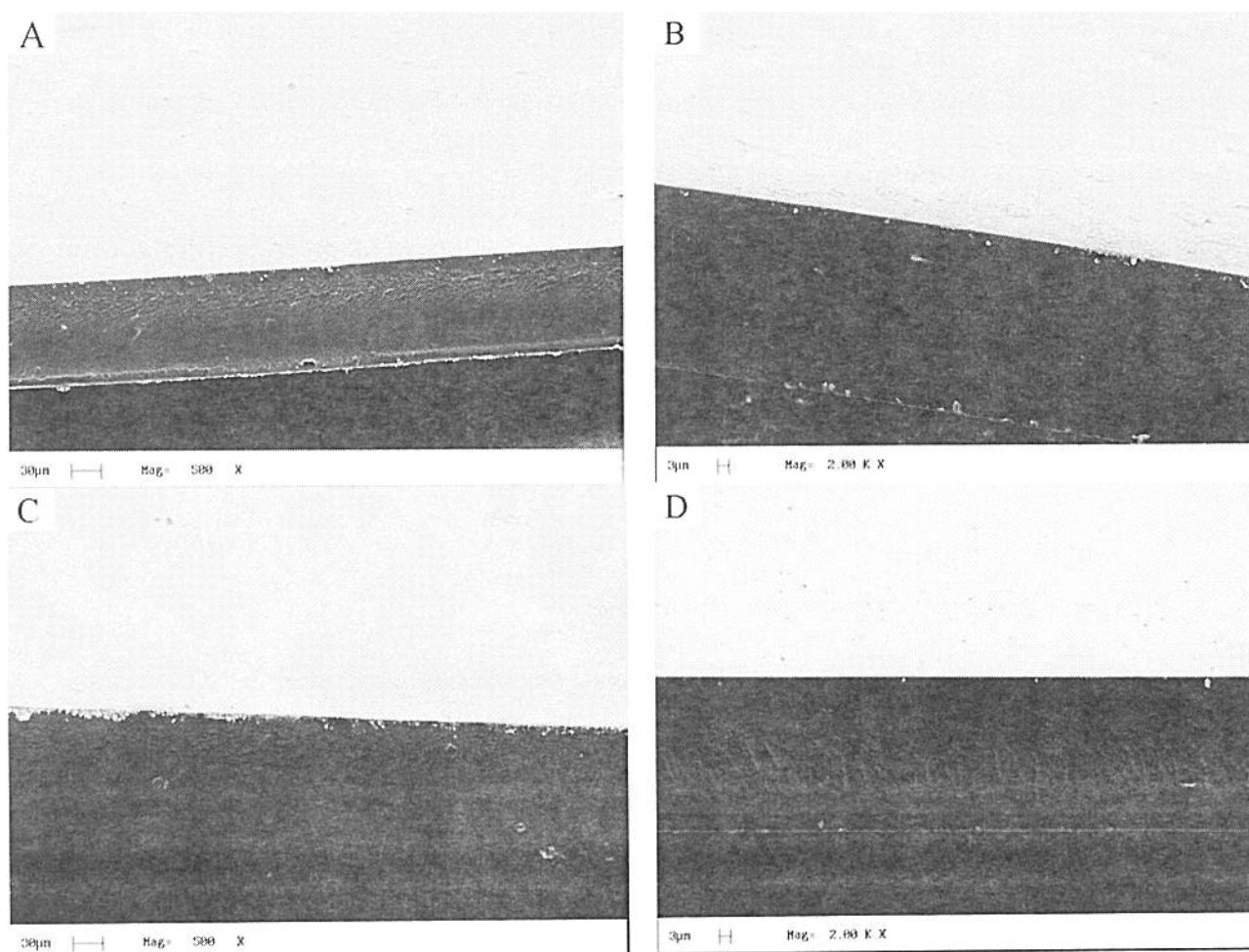


Fig. 2. Micrografias obtidas por MEV da seção interna de filmes a base de gelatina contendo extrato de yucca produzidos por extrusão (coluna esquerda, barra = 30 µm) e por *casting* (coluna direita, barra = 3 µm). (A) e (B) 48% extrato de yucca mais 8,75% glicerol, (C) e (D) 48% extrato de yucca mais 0,25% glicerol.

O tipo de processamento empregado na elaboração dos filmes a base de gelatina e extrato de yucca parece não ter influenciado a morfologia dos mesmos, pois observa-se na Fig. 2B e D que a estrutura da seção transversal dos filmes feitos por *casting* são muito semelhantes àquelas observadas para os filmes extrusados. Park et al. (2008) também compararam filmes de mesma formulação obtidos por *casting* e por extrusão, e observaram que os filmes feitos por *casting* apresentaram morfologia mais compacta quando

comparados aos filmes extrusados, efeito atribuído a mais rápida evaporação da água durante a extrusão, provocando o surgimento de micro poros. Por outro lado, Fishman et al. (2000) na extrusão de misturas de pectina e amido plastificadas com glicerol, observaram que a adição de água durante o processo de extrusão tendeu a produzir filmes com morfologia mais semelhante à estrutura observada para os filmes feitos por *casting*, efeito que foi observado no presente trabalho quando as morfologias das seções transversais foram comparadas.

3.2.4. Calorimetria diferencial de varredura

A avaliação calorimétrica dos filmes extrusados indicou a presença de mais de uma Tg (Tabela 4), possível indicação de separação de fases (Gontard e Ring, 1996; Sobral et al., 2001). A presença de dois picos endotérmicos já foi observada em trabalhos anteriores em filmes elaborados por *casting* (Sobral et al., 2001; Bertan et al., 2005, Pommet et al., 2003). A separação de fases poderia implicar em perda de flexibilidade dos filmes, mas, ao mesmo tempo, o plastificante atua como lubrificante, inserindo-se entre as cadeias protéicas, garantindo, dessa forma, a flexibilidade dos filmes (Debeaufort e Voilley, 1997). Por outro lado, em amostras de proteína isolada do soro de leite e glicerol aquecidas de 0 a 250 °C, a uma taxa de 20 °C min⁻¹, foram observados múltiplos picos iniciados por volta de 180 °C (Hernández-Izquierdo et al., 2008). De acordo com os autores, a presença de mais de um pico pode ser devido à degradação de componentes presente nos filmes. Enquanto que nos filmes elaborados por *casting* somente uma temperatura de transição vítrea foi detectada, independente da concentração do plastificante utilizada (0,25% ou 8,75% de glicerol). As Tg's obtidas para os filmes produzidos por extrusão são inferiores aos valores de Tg's observadas para os filmes produzidos por *casting*. A combinação da gelatina,

extrato de yucca e glicerol no processamento termoplástico, devido às condições drásticas de operação, temperatura e pressão, provavelmente favoreceu maior captação de água pelo material, maior plastificação e orientação estrutural em direção ao escoamento do equipamento. Esse comportamento acarretou na maior redução da T_g nos filmes extrusados, com elevados valores de alongamento para esses filmes quando comparados ao alongamento dos filmes por *casting*, conforme pode ser observado na Tabela 3.

O aumento na quantidade de glicerol utilizada no presente trabalho, não foi suficiente para produzir um abaixamento considerável das T_g 's obtidas, independente dos processos utilizados (Tabela 4), como observado anteriormente (Pushpadass et al., 2009). Os valores obtidos são, entretanto, inferiores aos reportados para a T_g de gelatina pura, variando de 200 a 220 °C (Slade e Levine, 1987; Pinhas et al., 1996; Sobral e Habitante, 2001), indicando que a adição do extrato de yucca poderia ter sido o responsável pelo efeito de abaixamento e conseqüente plastificação (di Gioia e Guilbert, 1999).

Tabela 4. Temperatura de transição vítrea (T_g) de filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão e por *casting*.

C_Y^1	C_G^1	Extrusão		Casting	
		T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)
48	0,25	77,56	56,59	98,90	-
48	8,75	85,33	67,96	97,96	-

¹ C_Y : Concentração de extrato de yucca (g 100g⁻¹ de proteína) e C_G : Concentração de glicerol (g 100g⁻¹ de proteína).

3.2.5. Espectroscopia de infravermelho

Observa-se que os espectros dos filmes obtidos pelos métodos de extrusão e por *casting* foram similares, e os comprimentos de ondas absorvidos não foram alterados (Fig.

3), indicando que os diferentes tipos de processamento não favoreceram a formação de interações adicionais entre os compostos utilizados (proteína, plastificante e surfactante). Independente do tipo de processamento utilizado observou-se que os espectros obtidos para os FE e FC apresentam os picos característicos da gelatina (Andreuccetti et al., 2009) e os picos típicos do extrato de yucca, conforme pode ser observado no Capítulo 5 (Fig. 6).

Nos espectros obtidos para os filmes produzidos por *casting* (Fig. 3B e D) observou-se uma absorbância insignificante na região de comprimento de onda de 3600 a 2800 cm^{-1} quando comparados aos picos apresentados nos espectros dos filmes produzidos por extrusão (Fig. 3A e C) onde se observa maior intensidade de absorbância. Essa região é indicativa da presença de grupos alcoólicos, que podem ser representados por compostos hidroxilas ou amino presentes na gelatina ou ainda devido a compostos como resveratrol and yuaccaols presentes no extrato de yucca (Piacente et al., 2004). Pareda et al. (2010) observaram que a intensidade do pico a 3300 cm^{-1} , associada a ligações H inter e intramoleculares, foi reduzida pela adição de óleo de “tungue” em filmes a base de caseinato, sugerindo a redução do caráter hidrofílico do filme a partir da adição do composto lipídico.

A alteração da banda do grupo C-O para frequências mais baixas indica a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio mais estáveis entre C-O e o plastificante (Ma et al., 2006), porém, para os filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol os comprimentos de ondas dessa região foram similares e, portanto não indicativo de aumento ou diminuição de interações.

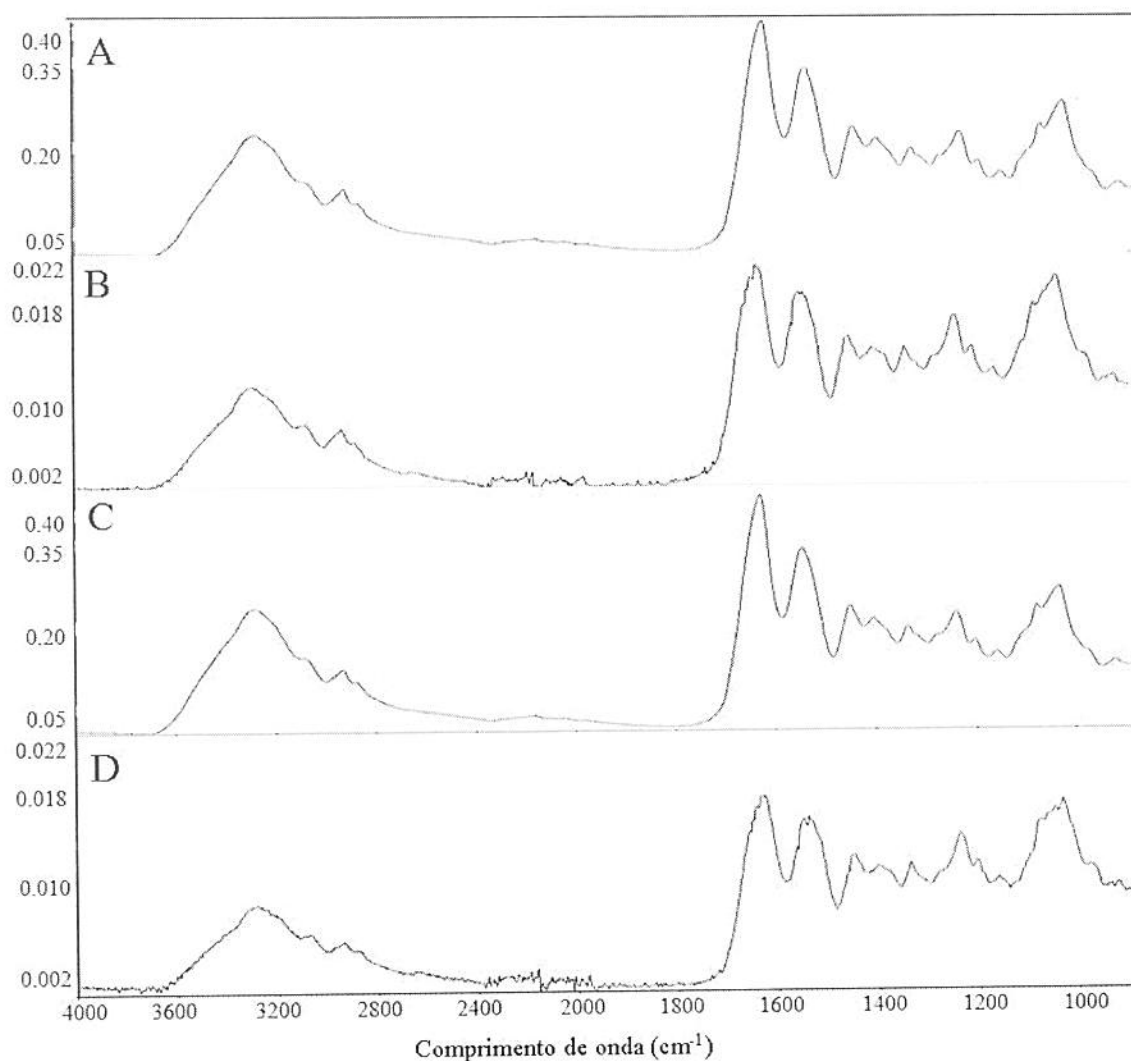


Fig. 3. Espectros de infravermelho de filmes a base de gelatina produzidos pelos métodos da extrusão (A e C) e por *casting* (B e D), contendo (A) e (B) 48% extrato de yucca mais 8,75% glicerol, (C) e (D) 48% extrato de yucca mais 0,25% glicerol.

3.2.6. Difração de raios-X

Na Fig. 4 e Tabela 5 apresentam-se, respectivamente, os padrões de difrações de raios-X e os graus de cristalinidade para os filmes estudados.

Tabela 5. Índice de cristalinidade relativa de filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão e por *casting*.

C_Y^I	C_G^I	Índice de cristalinidade relativa (%)	
		Extrusão	Casting
48	0,25	26,36 ± 0,21 ^{aB}	39,28 ± 0,53 ^{aA}
48	8,75	25,18 ± 0,18 ^{bB}	38,15 ± 0,11 ^{bA}

^I C_Y : Concentração de extrato de yucca (g 100 g⁻¹ de proteína); C_G : Concentração de glicerol (g 100 g⁻¹ de proteína), ^{a,b} Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferentes para a mesma linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas através do teste de Tukey.

O filme extrusado apresentou um padrão característico de gelatina com a presença de somente um pico ao redor do ângulo de difração de $2\theta = 23-24^\circ$ (Fig. 4). Comportamento semelhante foi observado por Qiu-Ping e Wen-Shui (2008) em difratogramas de filmes a base de gelatina. Na Fig. 4 observa-se um pico de maior intensidade para os filmes extrusados, independente da concentração de plastificante, enquanto nos difratogramas dos filmes feitos por *casting* há presença de dois picos, que independente da concentração de glicerol apresentaram-se por volta de $2\theta = 9^\circ$ e $2\theta = 24^\circ$. O pico presente ao redor de 9° tem relação estreita com os reportados por Yakimets et al. (2005 e 2007) nos filmes a base de gelatina. Segundo esses autores esse pico corresponde à presença de pequenas quantidades da estrutura tripla hélice da proteína. Em um processo de extrusão à temperaturas superiores a 100°C , a estrutura do biopolímero estaria destruída mostrando um típico modelo de estado amorfo em difratogramas de raios-X (Charbonniere et al., 1973). van Soest et al. (1996) observaram que diferentes tipos de processamento resultaram em mudanças significativas nos padrões dos difratogramas em filmes a base de amido, afetando o número de picos e a intensidade dos mesmos.

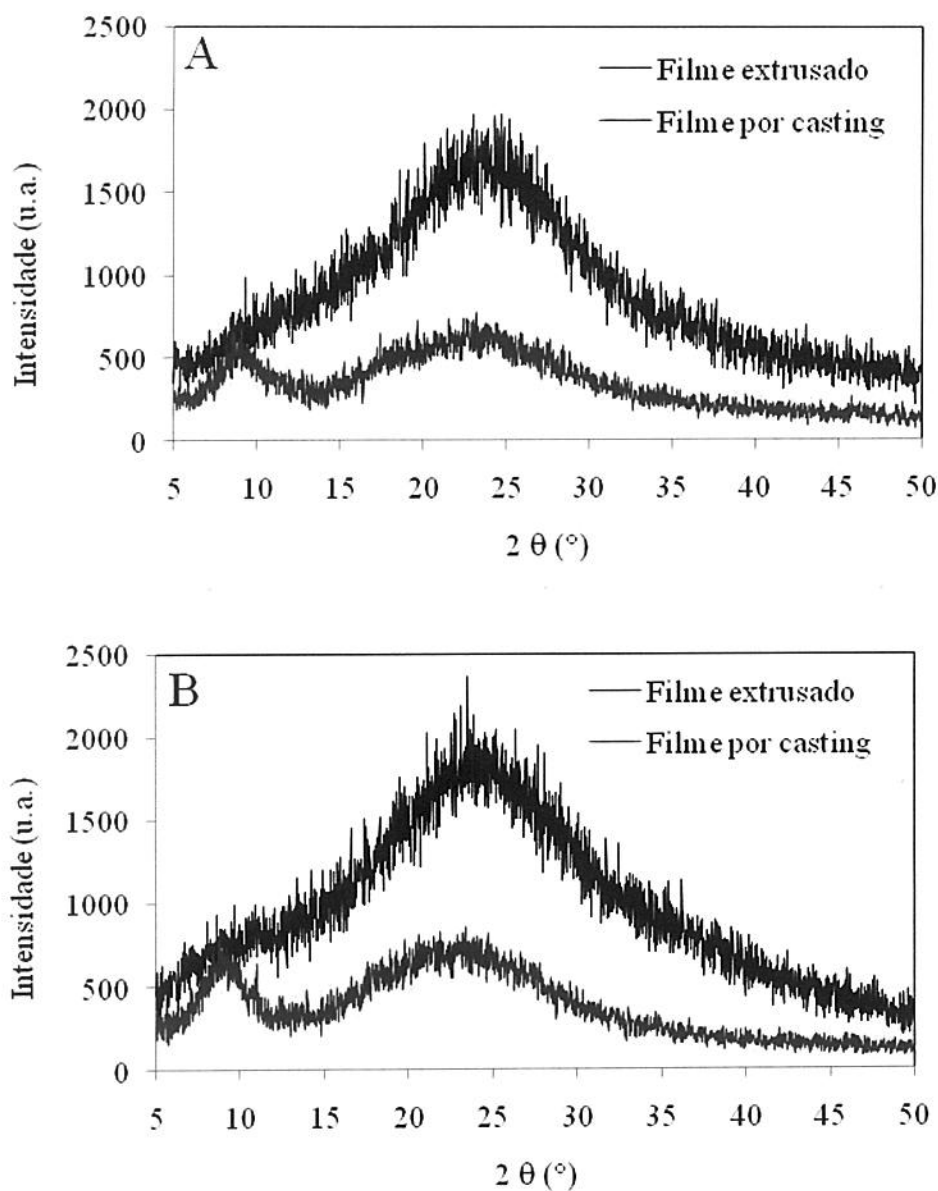


Fig. 4. Difrátogramas de raios-X dos filmes a base de gelatina produzidos pelos métodos da extrusão e por *casting*, contendo (A) 48% extrato de yucca mais 0,25% glicerol e (B) 48% extrato de yucca mais 8,75% glicerol.

Pinhas et al. (1996) reportaram que quando se utiliza amostras com umidade superior a 38% no processamento por extrusão de filmes a base de gelatina, os picos nos ângulos de 2θ de 7° e 31° são mais pronunciados, e esses estão relacionados a direcionalidade perpendicular da tripla hélice da protofibrila e dos aminoácidos residuais,

respectivamente. Esse comportamento não foi observado no difratograma obtido no presente estudo, possivelmente devido ao efeito apresentado pelo plastificante na diminuição da região cristalina. O plastificante pode promover o abaixamento da energia de ativação na formação da estrutura cristalina estável, facilitando a mobilidade e limitando o arranjo das cadeias poliméricas. Esse comportamento pode ser observado na Tabela 5, para os filmes obtidos tanto pelo processo de extrusão quanto para os filmes por *casting*, sendo que a maior concentração de glicerol gerou menor índice de cristalinidade relativa ($p \leq 0,05$) em relação aos filmes produzidos com a menor quantidade do plastificante.

4. Conclusões

O estudo mostrou a viabilidade do processamento termoplástico de filmes a base de gelatina contendo extrato de yucca através de um extrusor monorosca. O processamento pela extrusão gerou filmes significativamente mais espessos (160 a 250 μm) quando comparados aos filmes produzidos por *casting* ($\sim 55 \mu\text{m}$). Para os filmes extrusados as variáveis independentes (concentrações de extrato de yucca e de glicerol) não tiveram efeito significativo sobre a tensão de ruptura e teor de umidade, enquanto a concentração de glicerol teve efeito significativo sobre os valores de alongamento. Quando comparados os filmes extrusados com os filmes feitos por *casting*, os extrusados proporcionaram maiores valores de alongamento e reduzidas tensões na ruptura. Não foi observada diferença significativa quanto aos valores de solubilidade, independente do método de processamento empregado e da concentração de glicerol utilizada (média de 39%). Independente do método de produção utilizado para a formação dos filmes a base de gelatina e extrato de

yucca, a morfologia foi semelhante com estrutura interna compacta, homogênea e ausência de micro poros. A avaliação dos espectros de infravermelho, não evidenciou associação forte entre o extrato de yucca e a gelatina, independente do método de processamento utilizado, e filmes feitos por *casting* apresentaram maior índice de cristalinidade do que os filmes extrusados.

Referências

- Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2009). Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International*, 42, 1113-1121.
- Arvanitoyannis, I., Kalichevsky, M., Blanshard, J. M. V., & Psomiadou, E. (1994). Study of diffusion and permeation of gases in undrawn and uniaxially drawn films made from potato and rice starch conditioned at different relative humidities. *Carbohydrate Polymers*, 24, 1-15.
- ASTM Standard D 638-00 (2000). *Standard test method for tensile properties of plastics*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM Standard D 882-95 (1995). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Banker, G. S. (1966). Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science*, 55, 81-89.
- Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C., & Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19,

73-82.

Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2004). Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52, 6448-6455.

Carvalho, R. A., Sobral, P. J. A., Thomazine, M., Habitante, A. M. Q. B, Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22, 1117-1123.

Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2004). Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18, 717-726.

Charbonniere, R., duprat, P. & Guilbot, A. (1973). Changes in various starches by cooking extrusion processing. II Physical structure of extruded products. *Cereal Science Today*, 18, 286.

Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.-S. (2010). Water barrier and physical properties of starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films: impact of surfactant lamination. *Food Hydrocolloids*, 24, 200-207.

Chen, C.-H., Kuo, W.-S., & Lai, L.-S. (2009). Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in. *Food Hydrocolloids*, 23, 714-721.

Chen, C.-H., & Lai, L.-S. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids*, 22, 1584-1595.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1996). Rheological model for the

mechanical properties of myofibrillar protein-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1116-1122.

Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as effect by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 662-626.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Delport, B., & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180, 47-55.

Debeaufort, F., & Voilley, A. (1997). Methylcellulose-based edible films and coatings: 2. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 685-689.

di Gioia, L., & Guilbert, S. (1999). Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1254-1261.

Donhowe, I. G., & Fennema, O. (1993). The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical properties of methylcellulose films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 247-257.

Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.

Fishman, M. L., Coffin, D. R., Konstance, R. P., & Onwulata, C. I. (2000). Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydrate Polymer*, 41, 317-325.

Galiotta, G., di Gioia, L., Guilbert, S., & Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and

crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, 81, 3123-3130.

Ghorpade, V. M., Li, H., Gennadios, A., & Hanna, M. A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Transactions of the American Society of the Chemical Engineers*, 38, 1805-1808.

Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39-50.

Gontard, N., & Ring, S. (1996). Edible wheat gluten films: influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3474-3478.

Ha, T. T., & Padua, G. W. (2001). Effect of extrusion processing on properties of zein-fatty acids sheets. *Transactions of the ASAE*, 44, 1223-1228.

Hernández-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation – a review. *Journal of Food Science*, 73, R30-R39.

Hernández-Izquierdo, V. M., Reid, D. S., McHugh, T. H., Berrios, J. J., & Krochta, J. M. (2008). Thermal transition and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. *Food Engineering and Physical Properties*, 73, 169-175.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222, 229-235.

Kristo, E., & Biliaderis, C. G. (2006). Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate–pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, 20, 1057-1071.

Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Zampraka, A. (2007). Water vapor barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: biopolymer composition effects and

impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101, 753-764.

Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In Gennadios, A. (Ed.). *Protein-based films and coatings* (pp. 1-42). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Liu, L., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2005). Selection of optimum extrusion technology parameters in the manufacture of edible/biodegradable packaging films derived from food-based polymers. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3, 51-58.

Ma, X. F., Yu, J. G., & Wan, J. J. (2006). Urea and ethanolamine as a mixed plasticizer for thermoplastic starch. *Carbohydrate Polymers*, 64, 267-273.

Morillon, V., Debeaufort, F., Blond G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67-89.

Neto, B. B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (2002). Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp. 401p.

Paetau, I., Chen, C. Z., & Jane, J. L. (1994). Biodegradable plastic made from soybean products I: effect of preparation and processing on mechanical properties and water absorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 33, 1821-1827.

Pareda, M., Aranguren, M. I., Marcovich, N. E. Caseinate films modified with tung oil. *Food Hydrocolloids*, 24, 800-808.

Park, J. W., Whiteside, W. S., & Cho, S. Y. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *Food Science and Technology*, 41, 692-700.

Piacente, S., Montoro, P., Oleszek, W., & Pizza, C. (2004). *Yucca schidigera* Bark: phenolic constituents and antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, 67, 882-885.

- Pinhas, M. F., Blanshard, J. M. V., Derbyshire, W., & Mitchell, J. R. (1996). The effect of water on the physicochemical and mechanical properties of gelatin. *Journal of Thermal Analysis*, 47, 1499-1511.
- Pommet, M., Redl, A., Guilbert, S., & Morel, M. H. (2005). Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. *Journal of Cereal Science*, 42, 81-91.
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., & Guilbert, S. (2003). Study of wheat gluten plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44, 115-122.
- Prystupa, D. A., & Donald, A. M. (1996). Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. *Polymer Gels and Networks*, 4, 87-110.
- Pushpadass, H. A., Marx, D. B., Wehling, R. L., & Hanna, M. A. (2009). Extrusion and characterization of starch films. *Cereal Chemistry*, 86, 44-51.
- Qiu-Ping, Z., & Wen-Shui X. (2008). Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 262-269.
- Rabek, J. F. (1980). Experimental methods in polymer chemistry: applications of wide-angle X-ray diffraction (WAXD) to the study of the structure of polymers. Chichester, England: Wiley-Interscience, 505p.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (1999). Properties of ultraviolet irradiated protein films. *Food Science and Technology*, 32, 129-133.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39, 840-846.
- Slade, L., & Levine, H. (1987). Polymer-chemical properties of gelatin in foods. In

Pearson, A. M., Dutson, T. R., & Bailey, A. J. *Advances in meat research, collagen as food* (pp. 251-266), 4. New York: AVI Publishers.

Sobral, P. J. A. (2000). Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 1251-1259.

Sobral, P. J. A., Santos, J. S., & Garcia, F. T. (2005). Effect of protein and plasticizer concentrations in films forming solutions on physical properties of edible and films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. *Journal of Food Engineering*, 70, 93-100.

Sobral, P. J. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2001). Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15, 377-382.

Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15, 423-432.

Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.

Sothornvit, R., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (2003). Formation conditions, water-vapor permeability, and solubility of compression-molded whey protein films. *Journal of Food Science*, 68, 1985-1989.

Sothornvit, R., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (2007). Tensile properties of compression-molded whey protein sheets: determination of molding condition and glycerol-content effects and comparison with solution-cast films. *Journal of Food Engineering*, 78, 855-860.

Thomazine, M., Carvalho, R. A., & Sobral, P. J. A. (2005). Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. *Journal of Food Science*, 70, 172-176.

- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). Effect of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin based films. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-907.
- van Soest, J. J. G., Hullemann, S. H. D., & Vliegenthart, F. G. (1996). Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*, 5, 11-22.
- Verbeek, C. J. R., & van den Berg, L. E. (2010). Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 10-21.
- Vicentini, N. M. (2003). *Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita*. Tese de Doutorado. Botucatu: UNESP. 198p.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., & Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-509.
- Yakimets, I., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., Farhat, I., & Mitchell, J. (2005). Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*, 46, 12577-12585.
- Yakimets, I., Paes, S. S., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., & Mitchell, J.R. (2007). Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: a comparative study. *Biomacromolecules*, 8, 1710-1722.
- Wang, L., Auty, M. A. E., Rau, A., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2009). Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films. *Journal of Food Engineering*, 90, 11-19.
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288, 886-893.

CAPÍTULO 7
CONCLUSÃO GERAL

7. Conclusão geral

Quanto à produção dos filmes

A produção, por *casting*, dos filmes a base de gelatina incorporados com os plastificantes hidrofóbicos foi possível devido à presença dos surfactantes, lecitina de soja (primeira etapa) e extrato de yucca (segunda etapa), que permitiram a formação de uma matriz coesa e homogênea, sem exudação aparente dos plastificantes.

Além disso, a produção, por *casting*, dos filmes contendo somente os surfactantes (terceira etapa) também foi possível, com incorporação de elevados níveis dos surfactantes (até 120 g de surfactante 100 g⁻¹ de gelatina), sem que houvesse separação de fases aparente.

A produção, por extrusão (quarta etapa), dos filmes a base de gelatina e extrato de yucca proporcionou adequado processamento no extrusor monorosca, boa taxa de alimentação, fluxo contínuo e boa formação de filmes.

Quanto à eficiência na incorporação dos plastificantes hidrofóbicos

Primeira e segunda etapas: o uso da lecitina de soja permitiu a incorporação eficiente, sem que o filme apresentasse separação de fase dos plasticantes: citrato de tributila e citrato de acetiltributila (até 75 g de plastificante 100 g⁻¹ de gelatina). Enquanto a adição do extrato de yucca permitiu a incorporação dos quatro plastificantes testados, porém em níveis diferentes de concentração: citratos de tributila e acetiltributila até 75 g plastificante 100 g⁻¹ de gelatina, citrato de acetiltriethyl até 60 g plastificante 100 g⁻¹ de gelatina e citrato de triethyl até 40 g plastificante 100 g⁻¹ de gelatina.

Quanto às propriedades mecânicas

Tensão na ruptura (TR): o uso de quantidades crescentes de plastificantes (independente do tipo e do surfactante associado, lecitina ou extrato de yucca) nas formulações causou redução significativa nos valores de TR, com decréscimos de até 65% na primeira fase e de 44% na segunda fase. Na terceira etapa o decréscimo foi de 55% na TR de acordo com o aumento na concentração dos surfactantes. Na quarta etapa os valores de TR foram significativamente inferiores aos obtidos nas etapas anteriores, com variação de 19 a 34 MPa.

Alongamento (%A): a adição dos plastificantes hidrofóbicos não promoveu de forma significativa os valores de alongamento. Foram observadas variações de %A, na etapa quando lecitina foi utilizada, de 3 a 6% para citrato de tributíla e de 3 a 12,5% para acetiltributíla. Na etapa em que o extrato de yucca foi utilizado, as variações observadas foram de: 4 a 12,5% para citratos de tributíla, acetiltributíla e acetiltrietíla. Para a terceira etapa, o uso da lecitina promoveu valores de %A entre 7 e 22% e para extrato de yucca entre 4 e 7%. O processo de extrusão, devido a orientação das cadeias protéicas, promoveu valores de %A significativamente superiores aos observados nas etapas anteriores, com variação entre 40 e 160%.

Quanto à permeabilidade ao vapor de água

Primeira etapa: a permeabilidade ao vapor de água (PVA) sofreu ligeiro acréscimo com o aumento na concentração dos plastificantes. Os valores de PVA variaram entre 0,17 e 0,34 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹.

Segunda etapa: não foi observada correlação entre o aumento na quantidade de plastificante ou surfactante na redução da PVA. Valores mínimos obtidos de PVA foram

0,08; 0,07 e 0,06 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹ para acetiltributíla, tributíla e acetiltrietíla, respectivamente.

Terceira etapa: o aumento na quantidade de surfactante, independente do tipo, promoveu decréscimo na permeabilidade ao vapor de água, atingindo valores mínimos de 0,14 e 0,09 g mm m⁻² h⁻¹ kPa⁻¹ para filmes contendo, respectivamente, lecitina e extrato de yucca.

Quanto à solubilidade

Segunda etapa: o aumento na concentração dos plastificantes hidrofóbicos, independente do tipo empregado, causou acréscimo nos valores de solubilidade, com média de 54% de solubilidade para o nível mais elevado dos plastificantes (60 g de plastificante 100 g⁻¹ de gelatina).

Terceira etapa: filmes contendo extrato de yucca foram significativamente mais solúveis, com variação entre 20 a 52% de acordo com o aumento na concentração desse surfactante, quando comparados aos filmes contendo lecitina, que apresentaram média aproximada de 7% de solubilidade, sem diferença significativa entre os níveis de lecitina utilizados.

Quarta etapa: não foi observada diferença significativa quanto aos valores de solubilidade, independente do método de processamento empregado e da concentração de glicerol utilizada, a média obtida foi de 39% de solubilidade.

Quanto à morfologia

Microscopia eletrônica de varredura: para a primeira e segunda etapas: nos filmes contendo os plastificantes hidrofóbicos foram observadas morfologias superficiais e

estruturas internas mais heterogêneas e com zonas de descontinuidades. Maior heterogeneidade foi observada para os filmes contendo extrato de yucca, com presença de poros na sua seção interna, independente do tipo de plastificante utilizado.

Terceira etapa: com a retirada dos plastificantes hidrofóbicos, nessa etapa, observou-se uma morfologia mais coesa e homogênea, com estrutura interna mais compacta, principalmente para os filmes contendo extrato de yucca.

Quarta etapa: os filmes extrusados apresentaram uma estrutura morfológica interna homogênea, compacta e ausência de poros.

Microscopia confocal a laser de varredura (MCLV): na primeira etapa, a eficiência da lecitina enquanto agente surfactante pode ser comprovada pelas imagens de MCLV, observando-se grande homogeneidade entre os plastificantes hidrofóbicos e a matriz de gelatina.

Segunda etapa: as imagens de MCLV não indicaram incorporação homogênea dos plastificantes hidrofóbicos na matriz filmogênica hidrofílica.

Análises complementares

Espectroscopia de infravermelho: em todas as etapas do trabalho, pela análise dos espectros obtidos, não houve indicação de formação de novas interações entre os compostos adicionados (proteína, plastificantes e surfactantes), os espectros referentes às formulações representaram os picos característicos observados pelas substâncias puras.

Raios-X: na terceira etapa onde essa análise foi empregada observou-se nos difratogramas que a adição dos surfactantes, independente do tipo e da concentração, promoveu filmes com características mais amorfas quando comparados com o difratograma

do filme simples de gelatina.

Quarta etapa: o filme extrusado apresentou o padrão característico de gelatina com a presença de somente um pico ao redor do ângulo de difração de $2\theta = 23\text{-}24^\circ$.

Calorimetria diferencial de varredura: nos filmes extrusados foram observados dois picos de transição vítrea, possivelmente devido à falta de interação entre os compostos adicionados ou pela degradação dos componentes causada pelas condições drásticas de temperatura e pressão utilizadas no processamento termoplástico.

ANEXO I

VISÃO GERAL DO TRABALHO

SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Anexo I. Visão geral do trabalho e sugestões para pesquisas futuras

A hipótese inicial do trabalho foi a utilização de plastificantes hidrofóbicos com o intuito de se reduzir a susceptibilidade do filme protéico a base de gelatina às condições ambientais, principalmente com relação à umidade relativa, uma vez que esse tipo de material, com caráter polar, produz filmes com elevada permeabilidade ao vapor de água, limitando a sua aplicação, pois permite elevadas taxas de transferência de massa (vapor de água) entre o alimento e o ambiente que o circunda. A inclusão de compostos com características hidrofóbicas foi utilizada na tentativa de se minimizar esse problema. Num primeiro momento, utilizaram-se grandes quantidades de plastificantes hidrofóbicos, de forma que se pudesse avaliar o efeito de concentrações crescentes nas propriedades funcionais dos filmes resultantes, principalmente com relação à propriedade de barreira ao vapor de água e ainda contar com a promoção da flexibilidade dos filmes devido a adição de agentes plastificantes.

No entanto, a inserção desses plastificantes à matriz protéica somente foi possível devido a adição associada de um surfactante (primeira etapa do trabalho, lecitina de soja e segunda etapa, extrato de yucca). De acordo com testes preliminares, filmes de gelatina contendo os plastificantes hidrofóbicos, sem adição do surfactante, apresentaram separação de fases, com exudação aparente do plastificante sobre a superfície dos filmes, tornando-os inviáveis ao manuseio, sendo descartados para análise. Utilizaram-se surfactantes com diferentes graus de hidrofobicidades (lecitina insolúvel em água e extrato de yucca solúvel) devido a possibilidades de promoção de diferentes tipos de interações entre a matriz

protéica e os plastificantes. A diferença entre os surfactantes pôde ser observada pelo comportamento quanto à incorporação dos plastificantes (concentrações e tipo), tempo de secagem, propriedades funcionais e morfologia dos filmes obtidos nas diferentes etapas do trabalho. Porém uma lacuna observada está relacionada ao estudo da emulsão e das características dos surfactantes, e como sugestão para trabalhos futuros, recomenda-se a determinação de características físico-químicas destes agentes, de forma a subsidiar os diferentes comportamentos observados entre os dois surfactantes utilizados. Como, por exemplo, determinação do valor do Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB) e do nível de saturação do surfactante (concentração micelar crítica), embora, durante a terceira fase do trabalho, onde somente foram utilizados os surfactantes, não se observou exudação dos mesmos, mesmo a concentrações elevadas (120 g de surfactante 100 g⁻¹ de gelatina).

Foi observado que as soluções filmogênicas emulsionadas eram estáveis visualmente, pois não foi verificada separação de fase mesmo após 48 horas da solução em repouso, porém, recomenda-se a realização de um estudo sobre a estabilidade da emulsão e também completar os dados sobre a distribuição do diâmetro da gota da emulsão, caracterizando o tipo de emulsão formada pela mistura de tais compostos. Por exemplo, dúvidas com relação às diferenças morfológicas entre os filmes feitos com lecitina ou yucca e os valores de PVA por eles apresentados (1º e 2º etapas). O uso do extrato de yucca resultou em filmes com estrutura mais porosa, heterogênea, menos compacta quando comparada a seção interna dos filmes contendo lecitina, no entanto, os valores de PVA foram significativamente inferiores para filmes contendo extrato de yucca. Esperava-se que seções mais compactas, estruturalmente mais homogêneas oferecessem menores valores de PVA.

Nas duas primeiras etapas do trabalho, apesar de se ter produzido filmes a base de

gelatina com valores de PVA inferiores ou similares aos encontrados na literatura, o alongamento não pode ser promovido pela adição dos plastificantes hidrofóbicos.

Devido a alguns dados encontrados na literatura, onde se relatava que compostos anfífilos poderiam ser usados com função plastificante (di Gioia & Guilbert, 1999) optou-se pela retirada dos plastificantes hidrofóbicos e estudar somente o efeito de concentrações crescentes dos surfactantes nas propriedades funcionais de filmes a base de gelatina. Nessa fase, seguiu-se com o propósito de se melhorar as propriedades de barreira ao vapor de água, pois apesar da retirada dos plastificantes hidrofóbicos, os surfactantes apresentam características apolares e poderiam contribuir na obtenção de filmes com reduzidos valores de PVA.

As concentrações dos surfactantes que seriam utilizadas nessa etapa do trabalho foram fixadas de acordo com as quantidades dos compostos hidrofóbicos adicionados na primeira e na segunda etapas (plastificantes hidrofóbicos e surfactantes), ou seja, foram incorporadas níveis elevados de surfactantes, atingindo até 120 g 100 g⁻¹ de gelatina. Constatou-se que os filmes contendo somente os surfactantes promoveram a redução dos valores de PVA de acordo com o aumento nas concentrações dos surfactantes, sendo esses inferiores (quando a lecitina foi usada) e similares (quando o extrato de yucca foi usado) em relação aos valores observados em conjunto com os plastificantes hidrofóbicos nas duas primeiras etapas do trabalho. Nem o uso dos plastificantes nem o uso somente dos surfactantes promoveram a flexibilidade dos filmes, pois os valores de alongamento observados nesse estudo encontraram-se abaixo daqueles observados na literatura para filmes de gelatina, adicionados de plastificantes hidrofílicos (como sorbitol e glicerol). À parte dos valores de %A, os resultados de PVA e tensão na ruptura obtidos nesse trabalho mostraram-se promissores com relação a esses mesmos filmes contendo os plastificantes

hidrofílicos.

A baixa flexibilidade continuava limitando as possibilidades de aplicação desses filmes. Para sanar esse problema realizou-se uma modificação estrutural no filme, através do processamento termoplástico, tentando promover uma reordenação estrutural da proteína, e orientação das cadeias que ocorre no sentido do fluxo do equipamento. Essa orientação, como se houvesse a formação de fibras, foi um dos fatores responsáveis pela maior flexibilidade adquirida pelos filmes extrusados. Normalmente, em filmes extrusados, são observados altos valores de alongamento e reduzida tensão na ruptura quando comparados aos filmes obtidos por *casting*. Esse comportamento pode ser observado na última etapa desse trabalho no processamento de gelatina e extrato de yucca.

Para os testes preliminares realizados no extrusor foram testados os dois surfactantes (lecitina e extrato de yucca). Observou-se que altas quantidades de surfactantes não poderiam ser processadas no extrusor monorosca devido a limitação no conteúdo de umidade da amostra a ser processada. O limite máximo possível a ser processado foi de 35% de umidade. Estipulado esse limite as amostras, contendo gelatina e lecitina ou gelatina e extrato de yucca, começaram a ser processadas e observou-se que após armazenamento, os filmes extrusados perdiam umidade, ressecavam e consequentemente perdiam a sua flexibilidade, tornavam-se extremamente rígidos e quebradiços, dificultando o seu manuseio. Diante desse problema, optou-se pela inclusão de um composto com características hidrofílicas de forma que essa substância auxiliasse na manutenção da umidade e mantivesse a flexibilidade dos filmes mesmo após armazenamento. Dentre as possibilidades escolheu-se o glicerol, por ser um composto amplamente utilizado e discutido na literatura na produção de filmes biodegradáveis. Porém, definiu-se que as quantidades utilizadas de glicerol seriam baixas, sendo este adicionado à mistura proteína-

surfactante na tentativa de solucionar o problema de perda de umidade dos filmes extrusados.

Durante essa fase também foram observadas algumas lacunas, recomenda-se o estudo de diferentes perfis de temperatura, velocidades de alimentação e da rosca, uso de um extrusor de rosca dupla, permitindo a realização de um estudo do efeito dos parâmetros de extrusão sobre as propriedades funcionais desse tipo de filme.

Muitas foram as dificuldades encontradas no processamento das amostras com lecitina, pois a lecitina com característica mais oleosa que o extrato de yucca, possuía pouco atrito entre a rosca e a camisa do canhão. O material, por sua vez, não tinha o tempo de retenção necessário dentro do equipamento para gerar a plastificação da gelatina, além de que, causava muitos problemas de entupimento no funil de alimentação e consequentemente na saída da matriz, que devido a falta de fluxo contínuo ao longo do extrusor obstruía a saída constantemente. A mistura formada com a gelatina e a lecitina também formava aglomerados devido ao caráter oleoso da lecitina e isso também dificultou a alimentação manual do equipamento. Por isso, acredita-se que a utilização de um extrusor dupla rosca onde haja compartimentos de alimentação separados para substâncias líquidas e sólidas proporcionaria melhores condições de mistura e cisalhamento do material, até mesmo pela própria conformação de roscas desse tipo de extrusor. Dentro do planejamento havia sido estabelecido que as variáveis independentes seriam somente as concentrações de surfactantes e glicerol e que as condições de processamento seriam fixadas para todas as formulações. No entanto, além das dificuldades já mencionadas acima com relação às amostras contendo lecitina, dependendo da formulação, as condições para o processamento, como perfil de temperatura e velocidade da rosca, tiveram que ser alteradas de forma a proporcionar o manufaturamento das amostras com lecitina. Devido aos problemas

encontrados, o planejamento previamente estabelecido para a mistura gelatina-lecitina não pode ser completado em tempo hábil para o término na tese, por isso, dados preliminares obtidos dos filmes extrusados de gelatina e lecitina estão apresentados no Anexo IV.

Seria necessária também a utilização de um sistema de calandras para promover a uniformidade da espessura dos filmes resultantes. Os filmes eram tracionados do extrusor manualmente, e as amostras saíam com aproximadamente 70-80 °C. Além do que, com as condições operacionais, de taxa de alimentação e perfil de temperatura, equilibradas, um escoamento contínuo era atingido dentro do canhão extrusor. Dessa forma as amostras escoavam muito rápido do equipamento e nem sempre era possível obter um tracionamento contínuo e homogêneo dos filmes.

Além da Acréscimo da água, que foi realizada através de um balanço de umidade, para que as misturas atingissem o conteúdo de umidade determinado nos testes preliminares, a adição de água na mistura gelatina e surfactantes também foi de extrema importância para garantir um processamento e plastificação eficientes das amostras. Inicialmente observou-se que amostras sem a adição de água resultavam em filme com presença de grânulos de gelatina sem se fundir, como se não tivessem alcançado a sua devida plastificação, mesmo em condições operacionais mais drásticas de temperatura.

A partir dos filmes obtidos nessa etapa de extrusão, escolheu-se a formulação que gerou maior valor de alongamento e realizou-se o seu processamento por extrusão seguida de sopro. A formulação contendo lecitina não pode ser soprada, pois não apresentou uma plastificação homogênea da gelatina ao longo do canhão extrusor, dificultando sua alimentação e posterior sopro. Dessa forma, para estudos futuros adequar as condições operacionais e ajustar a concentração de lecitina de forma que se permita o transporte do material pela rosca. No caso da amostra contendo extrato de yucca (Anexo V), foi possível

a obtenção de filmes soprados, porém esses apresentaram alta adesividade, devido ao próprio efeito do surfactante, dificultando tomada de amostras para a realização de algumas análises, como propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. Recomenda-se o estudo de efeitos combinados de temperatura e umidade, pois esses determinam as propriedades reológicas do material soprado, evitando perdas excessivas de água e conseqüente formação de filmes duros, rígidos e sem plastificação (Wang e Padua, 2003), como foi observado para o processamento de amostras contendo lecitina, onde não ocorreu uma eficiente plastificação da gelatina. Mais estudos necessitam ser realizados no processamento termoplástico de materiais biodegradáveis, seja pela extrusão ou pela extrusão seguida de sopro, de forma a tornar promissor a sua produção industrial, utilização e aplicação desses materiais, uma vez que mudanças estruturais provocada nas proteínas a partir desse tipo de processo podem beneficiar as propriedades funcionais dos filmes. É esperado que condições ótimas como, por exemplo, de umidade e temperatura, sejam ajustadas de acordo com cada extrusor e condições operacionais.

Quanto aos resultados observados na quarta etapa do trabalho (Capítulo 6, extrusão) e adicionalmente aos resultados apresentados no Anexo V (extrusão-sopro) pode-se dizer que são dados muitos promissores, principalmente pela viabilidade apresentada no processamento termoplástico da gelatina e extrato de yucca e pela capacidade de boa formação de filme. Estudos futuros, com adequações das variáveis das condições de processamento poderão oferecer maiores subsídios, tornando a fabricação desse tipo de material (filmes extrusados a base de biopolímeros) uma possibilidade real de aplicação industrial, como, por exemplo, fabricação de bolsas, sacolas, sachês e envoltórios para alimentos. E ainda, investigando-se também a técnica de moldagem por compressão e injeção termoplástica de biopolímeros, outras alternativas seriam oferecidas na produção de

materiais biodegradáveis. A produção de utensílios descartáveis, como copos e pratos, poderia tornar-se uma opção a ser investigada.

Nesse trabalho, nas primeira e segunda etapas, foram analisadas elevadas quantidades de plastificantes hidrofóbicos associados a baixos níveis de surfactantes, por outro lado na quarta etapa foram utilizadas altas concentrações de surfactantes e baixas de plastificantes hidrofílicos. Para pesquisas futuras seria interessante o estudo de novas combinações de quantidades de plastificantes e surfactantes, como por exemplo, o estudo do efeito de baixos níveis de plastificante hidrofóbico e altos de surfactantes. Também seria interessante cobrir a reprodução completa, por *casting*, das formulações elaboradas na quarta etapa.

Referências Bibliográficas

- di Gioia, L., & Guilbert, S. (1999). Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1254-1261.
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288, 886-893.

Anexo II. Especificações técnicas: plastificantes hidrofóbicos

Tabela A.II: Características físico-químicas de plastificantes hidrofóbicos (Vertellus, 2010).

<i>Características</i>	<i>Citrato de acetiltributíla</i>	<i>Citrato de tributíla</i>	<i>Citrato de acetiltrietíla</i>	<i>Citrato de trietíla</i>
Registro químico	77-90-7	77-94-1	77-89-4	77-93-0
Aparência	Oleosa, líquido, claro	Oleosa, líquido, claro	Oleosa, líquido, claro	Oleosa, líquido, claro
Odor	Sem odor	Sem odor	Sem odor	Sem odor
Conteúdo de éster (%)	99,0 mínimo	99,0 mínimo	99,0 mínimo	99,0 mínimo
Acidez (%) – ácido cítrico	0,02 máximo	-	-	-
Neutralização (mg KOH g ⁻¹)	-	0,20 máximo	0,20 máximo	0,2 máximo
Água (%)	0,25 máximo	0,30 máximo	0,30 máximo	0,25 máximo
Ponto de ebulição (°C)	327	325	297	294
Ponto de fusão (°C)	-59	-62	-42	-45
Viscosidade a 25 °C (cps)	33	32	54	35
Solubilidade (%)				
Água a 25 °C	< 0,1	< 0,1	0,72	5,5
Tolueno	∞	∞	∞	∞
Heptano	∞	∞	Insólúvel	Insólúvel
Pressão de vapor	-	1 mmHg a 170 °C	< 1 mmHg a 25 °C	< 1 mmHg a 25 °C
Densidade de vapor	14,1	12,4	11,1	9,7

Anexo III. Caracterização dos surfactantes: lecitina de soja e extrato de yucca

Tabela A1.III: Valores de umidade, insolúveis em acetona e ácidos graxos da lecitina de soja comercial.

<i>Componentes</i>	<i>Lecitina de soja comercial</i>
Umidade (%)	0,26
Insolúveis em acetona (%)	26,6
Ácidos graxos (%)	
C14:0 (Mirístico)	0,09
C16:1 (Palmítico)	16,57
C16:1 (Palmitoléico)	0,09
C18:0 (Estearico)	3,71
C18:1 (Oléico)	19,29
C18:2 (Linoléico)	53,85
C18:3 (Linolênico)	5,34
C20:0 (Araquídico)	0,26
C20:1 (Gadoléico)	0,15
C22:0 (Behênico)	0,44
C24:0 (Lignocérico)	0,21

Tabela A2.III. Propriedades físico-químicas do extrato de *Yucca schidigera*.

<i>Propriedade</i>	<i>Yucca schidigera</i> ¹
Umidade (%)	50
Estado físico	Líquido
Cor	Marrom avermelhado
Odor	Característico
pH	Levemente ácido para solução 10%
Ponto de ebulição (°C)	102
Ponto de fusão	Não aplicável
Solubilidade	Solúvel completamente em água
Densidade (g L ⁻¹)	1,2
Teor de saponinas esteroideal (%)	10

¹Fonte: informações cedidas pelo fornecedor (Beraca Sabará Químicos e Ingredientes Ltda.).

Anexo IV. Filmes extrusados a base de gelatina e lecitina de soja

Material e métodos

Material

Para a produção dos filmes extrusados foram utilizados: gelatina suína tipo A (260 bloom) fornecida por Gelita México (Lerma, Estado do México); glicerol (CAS nº 56-81-5, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) e lecitina de soja comercial.

Métodos

As análises de propriedades mecânicas, solubilidade, umidade, morfologia, temperatura de transição vítrea, espectroscopia de infravermelho e raios-X foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 6, item 2. Foi realizado também a análise qualitativa da curva de sorção de umidade usando-se um Dynamic Vapor Sorption Analyser DVS-1 (DVS Isotherm Analysis Report, SMS Surface Measurement Systems, Allentown, EUA) equipado com um microbalança Cahn D200. Os experimentos foram conduzidos a 25 ± 2 °C e umidade relativa variando de 50 a 95% e os resultados foram avaliados através do DVS Windows Versão 2.06.

Produção dos filmes extrusados

A metodologia utilizada para o processamento de filmes a base de gelatina contendo

lecitina foi a mesma descrita no Capítulo 6 para a produção de filmes extrusados contendo extrato de yucca. A descrição do extrusor monorosca utilizado também pode ser observado no Capítulo 6. Os parâmetros fixos do processo foram: concentração de gelatina (4%), teor de umidade (35%), taxa de alimentação (16 rpm), velocidade da rosca (47,20 rpm), perfil de temperatura: zona de alimentação 85 °C; zona de cisalhamento 100 °C e; zona de compressão 75 °C.

Desenho experimental

O mesmo padrão de desenho experimental ($2^2 + \alpha$) descrito no Capítulo 6 foi utilizado para o processamento dos filmes contendo lecitina. O máximo nível de lecitina que foi possível de ser processado no extrusor monorosca foi 48 g de surfactante 100 g⁻¹ de gelatina a 35% de umidade, conforme determinado por ensaios preliminares. Glicerol foi adicionado aos níveis de 1 a 5 g de plastificante 100 g⁻¹ total da mistura. As variáveis independentes (concentrações de lecitina e glicerol) com seus níveis codificados e a matriz do desenho experimental podem ser observados na Tabela A1.IV.

Resultados preliminares

O uso da lecitina apresentou algumas limitações com relação ao processamento do material dependendo das concentrações de surfactante e glicerol associadas. Encontraram-se dificuldades na alimentação do equipamento, muitas vezes ocorria o entupimento do funil de alimentação e com isso não era possível obter um escoamento contínuo,

conseqüentemente o cisalhamento e compressão do material não aconteciam uniformemente, não proporcionando boas condições de formação do filme.

Tabela A1.IV. Matriz do delineamento experimental para os filmes extrusados com lecitina com as variáveis reais e codificadas e as respostas do processo.

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis codificadas (reais)</i>		<i>Propriedades funcionais</i>		
	$X_1 (C_L)^1$	$X_2 (C_G)^1$	$TR (MPa)^3$	$A (\%)^3$	$Umi (\%)^3$
1	+1 (48) ²	+1 (5)	13,6 ± 2,2 ⁴	140,9 ± 11,4	12,5 ± 0,5
2	-1 (28)	-1 (1)	10,9 ± 1,3	162,0 ± 14,6	Nd ⁵
3	+1 (48)	-1 (1)	10,9 ± 3,1	184,3 ± 0,3	11,5 ± 4,9
4	-1 (28)	+1 (5)	-	-	-
5	-1,414 (23,86)	0 (3)	16,5 ± 2,1	67,2 ± 21,3	12,4 ± 0,3
6	+1,414 (52,14)	0 (3)	13,0 ± 1,8	170,7 ± 15,9	11,1 ± 0,7
7	0 (38)	+1,414 (5,83)	20,7 ± 0,6	119,6 ± 11,4	11,5 ± 0,9
8	0 (38)	-1,414 (0,17)	-	-	-
9	0 (38)	0 (3)	-	-	-
10	0 (38)	0 (3)	13,2 ± 1,7	163,4 ± 11,1	Nd ⁵
11	0 (38)	0 (3)	18,2 ± 2,7	95,1 ± 11,9	11,9 ± 0,4

¹ $X_1=C_L$ =concentração de lecitina (g 100 g⁻¹ de gelatina); $X_2=C_G$ =concentração de glicerol (g 100 g⁻¹ do total da mistura). ² Valor entre parênteses corresponde às variáveis reais. ³ TR: tensão na ruptura, A: alongamento e Umi: umidade. ⁴ Média ± desvio padrão. ⁵ Nd: não determinado, devido a crescimento microbiano nas amostras.

Para algumas formulações, as condições previamente fixadas de operação do extrusor, não permitiram a homogeneização do material, onde a lecitina não se incorporava eficientemente a rede protéica, com presença dos grânulos de gelatina, indicando a falta de plastificação da proteína. Na tentativa de ajustar o processamento dos filmes contendo lecitina, as condições operacionais de funcionamento do equipamento, como taxa de

alimentação e perfil de temperatura, sofreram alterações dependendo da formulação a ser processada, de acordo com Table A2.IV. No entanto, as formulações cujas concentrações de lecitina e glicerol associadas permitiram boas condições de processamento, resultaram em filmes resistentes, flexíveis e altamente manuscáveis.

Tabela A2.IV. Adequação das condições de processamento no extrusor para as amostras contendo lecitina (taxa de alimentação: 16 rpm).

<i>Ensaio</i>	<i>Velocidade da rosca</i>	<i>Temperatura alimentação</i>	<i>Temperatura cisalhamento</i>	<i>Temperatura compressão</i>
1, 3, 9, 11	30 Hz	80 °C	100 °C	65 °C
4, 7, 10	30 Hz	85 °C	105 °C	65 °C
2	34 Hz	80 °C	90 °C	65 °C

Propriedades mecânicas

Os valores de tensão na ruptura (TR) para os filmes contendo lecitina variaram entre 10,9 e 20,7 MPa (Tabela 1A.IV), no geral, foram inferiores aos obtidos para os extrusados com yucca (Capítulo 6). Por outro lado, os valores de alongamento foram superiores aos observados para os filmes processados com lecitina, atingindo o máximo de alongamento de 184% para a formulação 48 g de lecitina 100 g⁻¹ de gelatina e 1 g de glicerol 100 g⁻¹ total da mistura.

Umidade

Não houve diferença significativa, para a umidade dos filmes, entre as formulações estudadas, os valores variaram de 11 a 12,5%, com média de 11,8% (Tabela 1A.IV). Os

valores de umidade para filmes contendo extrato yucca, apresentados no Capítulo 6, foram ligeiramente superiores em relação aos filmes contendo lecitina.

Casting x Extrusão

Para a comparação entre filmes processados por extrusão ou feitos por *casting* foram escolhidas as formulações que resultaram em maior e menor valores de alongamento para os filmes extrusados que foram reproduzidos pela técnica de *casting*.

Propriedades mecânicas

Na Tabela A3.IV observa-se a comparação entre os filmes obtidos por extrusão e por *casting* com relação às propriedades mecânicas, solubilidade e umidade. O mesmo comportamento obtido para os filmes contendo extrato de yucca (Capítulo 6) foi observado para os filmes extrusados com lecitina, com elongações significativamente superiores e reduzidas tensões na ruptura obtidas para os filmes extrusados em relação aos filmes produzidos por *casting*.

Solubilidade e umidade

A solubilidade (Tabela 3A.IV) dos filmes parece ter sido influenciada pela concentração de glicerol adicionada à formulação, sendo que a maior quantidade de glicerol utilizada proporcionou os maiores valores de solubilidade, independente do método empregado para a produção dos filmes. Com a adição de 3% de glicerol, o filme extrusado tenha apresentado solubilidade significativamente maior em relação ao filme feito por *casting*. A umidade dos filmes extrusados foi superior à umidade observada para os filmes

feitos por *casting*.

Tabela A3.IV. Comparativo entre as propriedades mecânicas e solubilidade para os filmes a base de gelatina, lecitina e glicerol, produzidos por *casting* e extrusão.

C_L^1	C_G^1	Método	TR (MPa) ²	A (%) ²	Sol (%) ²	Umi (%) ²
48	1	Extrusão	10,9 ± 3,1 ^d	184,3 ± 0,3 ^a	25,9 ± 3,9 ^c	11,5 ± 4,9 ^a
		Casting	46,9 ± 2,1 ^b	18,7 ± 3,8 ^c	29,9 ± 2,9 ^c	5,3 ± 0,6 ^c
23,86	3	Extrusão	16,5 ± 2,1 ^c	67,2 ± 2,3 ^b	63,2 ± 6,8 ^a	12,4 ± 0,3 ^a
		Casting	65,5 ± 0,9 ^a	15,8 ± 2,1 ^c	48,9 ± 4,9 ^b	7,5 ± 0,6 ^b

¹ C_L : Concentração de lecitina (g de surfactante 100 g⁻¹ de gelatina); C_G : Concentração de glicerol (g de plastificante 100 g⁻¹ do total da mistura). ² TR: tensão na ruptura, A: alongamento, Sol: solubilidade e Umi: umidade. ^{a,b} Média ± desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

Curva de sorção de umidade

Pela análise da curva de sorção de umidade (Fig. A1.IV) observa-se que o filme processado com lecitina possui menor ganho de massa de acordo com o aumento da umidade relativa quando comparado ao filme extrusado com extrato de yucca e ao filme simples de gelatina, isso provavelmente devido a diferença de polaridade entre esses surfactantes. A presença da lecitina conferiu ao filme extrusado um caráter mais hidrofóbico, refletido pela menor sorção de umidade.

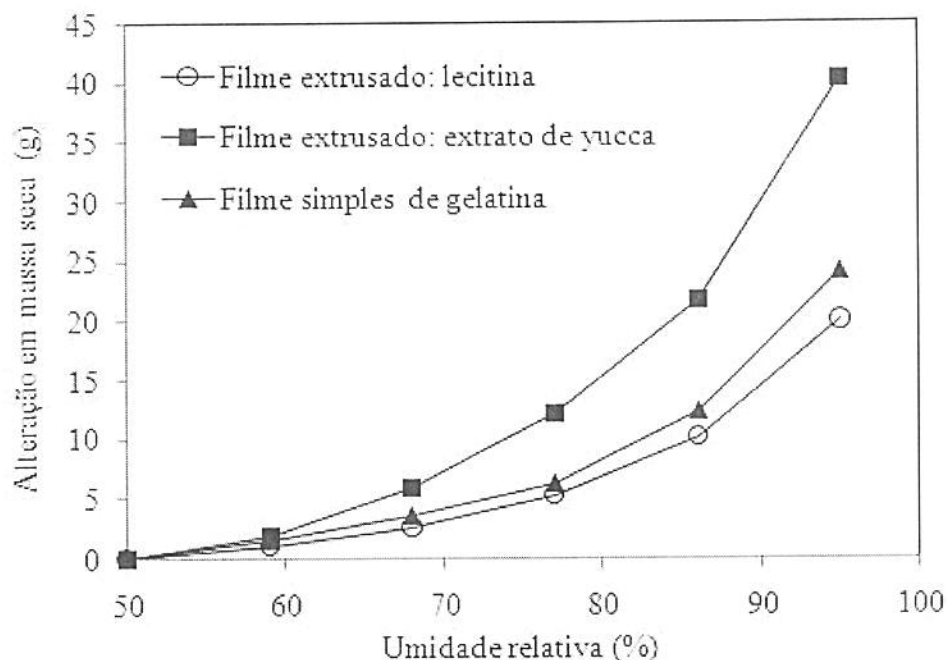


Fig. A1.IV. Curva de sorção de umidade para filmes extrusados a base de gelatina contendo lecitina.

Microscopia eletrônica de varredura

As imagens das seções transversais dos filmes a base de gelatina e lecitina podem ser observadas na Fig. A2.IV. Observa-se que os filmes extrusados (Fig. A2.IV A e C) apresentam aspecto de fibras orientadas, principalmente para o filme com maior conteúdo de lecitina. Ha e Padua (2001) também observaram que o processamento de resina de zeína por extrusão promoveu a formação de “fibras” de zeína, e essas fibras possivelmente estariam orientadas, onde essa orientação poderia efetivamente melhorar as propriedades mecânicas do material formado. Quando comparadas às seções transversais dos filmes extrusados e por *casting*, observa-se que os extrusados possuem tendência de maior organização estrutural, com uma morfologia mais compacta que os filmes elaborados por *casting* (Fig. A2.IV B e D).

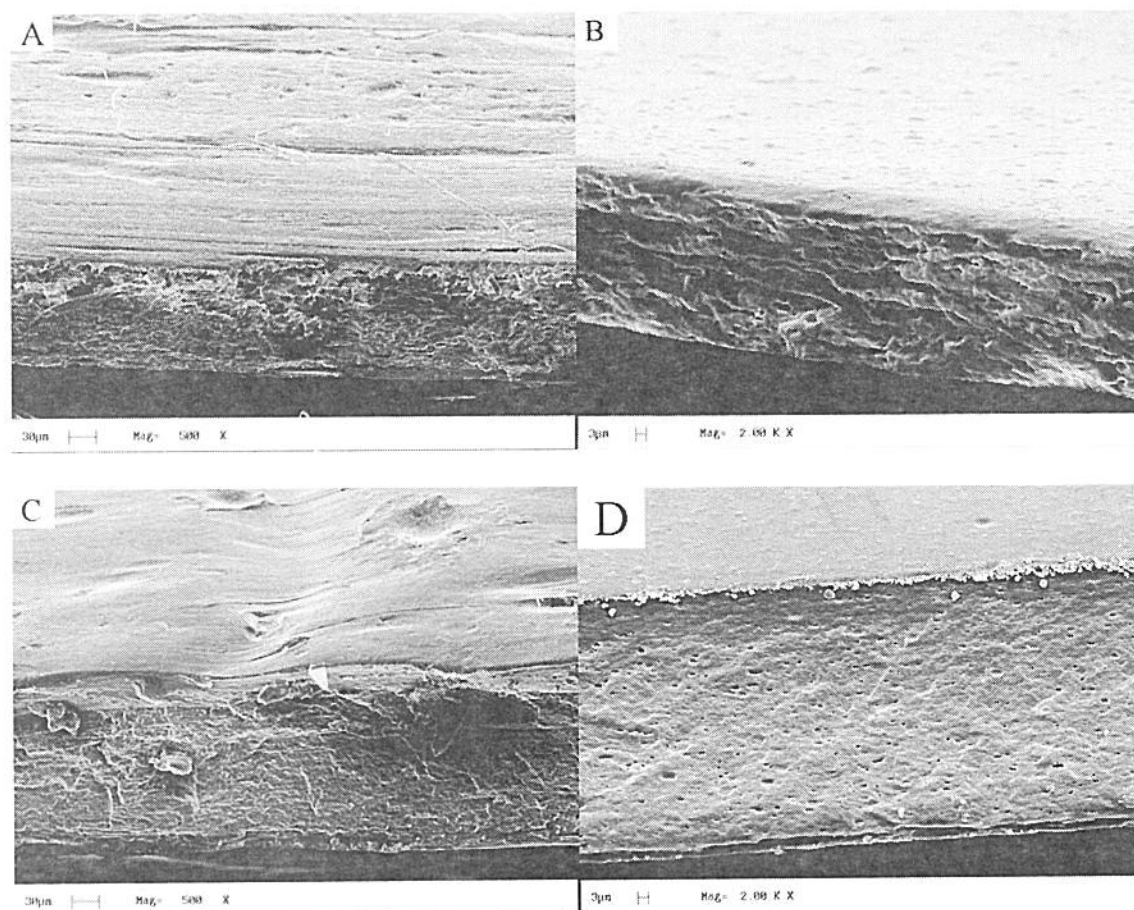


Fig. A2.IV. Morfologia da seção interna de filmes a base de gelatina contendo lecitina, produzidos pelos métodos de extrusão (coluna da esquerda, barra = 30 μm) e por *casting* (coluna da direita, barra = 3 μm). (A) e (B) 48% lecitina e 1% glicerol; (C) e (D) 23,86% lecitina e 3% glicerol.

Temperatura de transição vítrea

Na análise calorimétrica dos filmes processados com lecitina (Tabela A4.IV) observa-se a presença duas temperaturas de transição vítrea (T_g) um indicativo de que não houve interação eficiente dos compostos adicionados. No entanto, para os filmes elaborados por casting somente observa-se a presença de mais de um pico para a formulação com maior quantidade de lecitina. Os filmes extrusados possuem menor T_g quando comparados ao filmes feitos por *casting*, podendo ser reflexo do maior

alongamento observado para os extrusados, conforme observado previamente no Capítulo 6 (item 3.2.4.) para filmes de gelatina extrusados com extrato de yucca.

Tabela A4.IV. Temperatura de transição vítrea (T_g) dos filmes extrusados e feitos por *casting* a base de gelatina contendo lecitina.

C_L^1	C_G^1	<i>Extrusão</i>		<i>Casting</i>	
		T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)
23,86	3	84,93	61,12	107,13	-
48	1	91,10	61,86	108,85	86,89

¹ C_L : Concentração de lecitina (g de surfactante 100 g⁻¹ de gelatina); C_G : Concentração de glicerol (g de plastificante 100 g⁻¹ do total da mistura).

Espectroscopia de infravermelho

Na Fig. A3.IV observa-se os espectros obtidos para os filmes a base de gelatina e lecitina extrusados e feitos por *casting*. Os filmes extrusados e os elaborados por *casting* possuem os mesmos picos característicos absorvidos para os mesmos comprimentos de onda, indicação de que, independente do método de produção, não houve a promoção de interações fortes entre os compostos adicionados. Tal comportamento também pode ser observado para os filmes contendo extrato de yucca (Capítulo 6). Os picos característicos da lecitina encontram-se entre os comprimentos de onda de 3700 a 2700 cm⁻¹ (estiramento do grupo fosfato OH), de 1400 a 1800 cm⁻¹ (estiramento de C = O) e de 1240-1260 cm⁻¹ (estiramento assimétrico de PO₂) (Derkach et al., 2005), e são representados com maior absorbância onde a concentração de lecitina é maior quando comparado a menor quantidade desse surfactante (Fig. A3.IV).

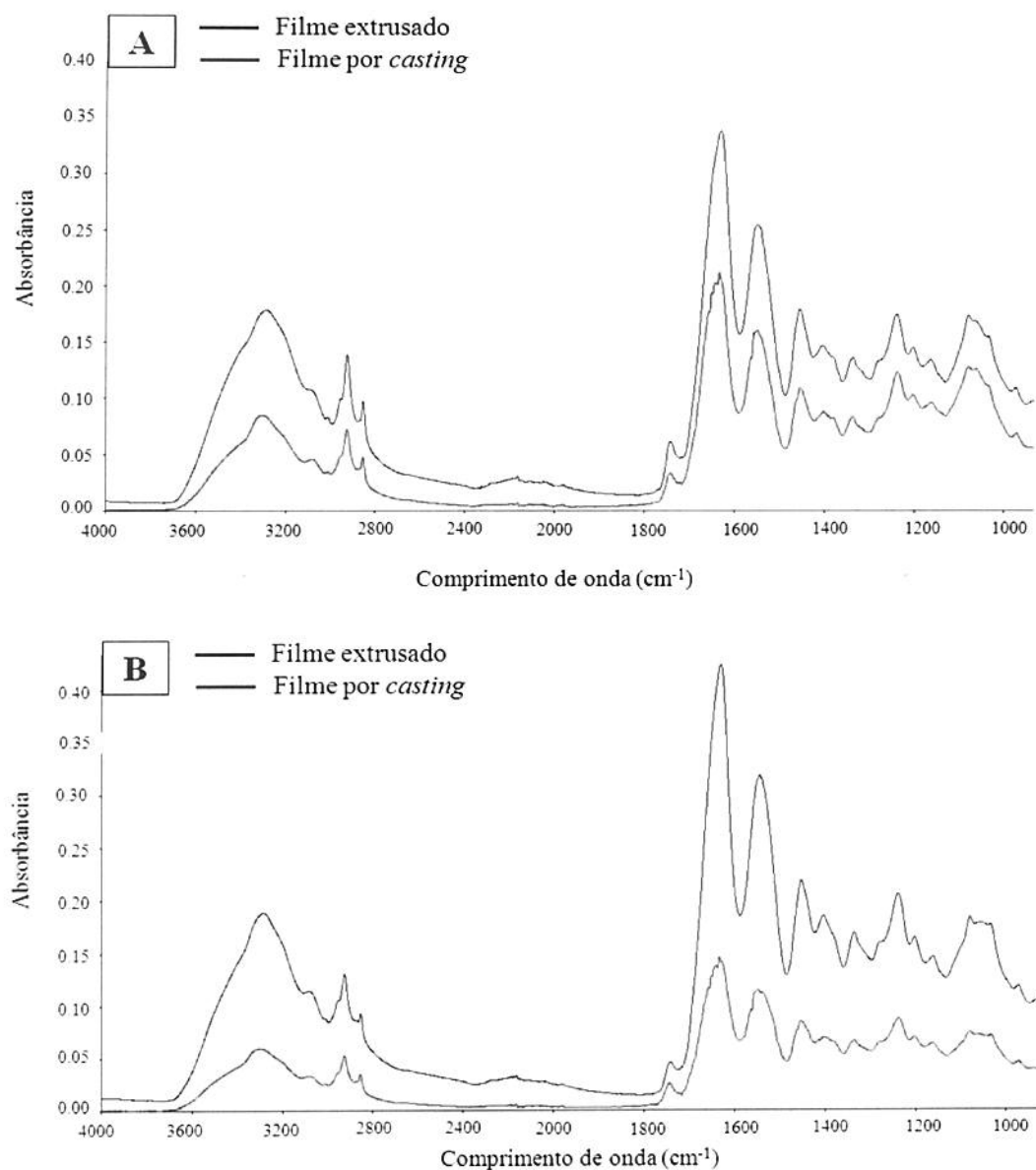


Fig. A3.IV. Espectros de infravermelho de filmes extrusados e feitos por *casting* a base de gelatina contendo lecitina. (A) 48% lecitina e 1% glicerol, (B) 23,86% lecitina e 3% glicerol.

Difração de raios-X

Na Fig. A4.IV pode-se observar o padrão dos difratogramas de raios-X para os filmes obtidos por extrusão e por *casting*. No caso onde a concentração de lecitina foi maior (48% de lecitina, Fig. A4.IV, A), observa-se que os difratogramas são semelhantes quanto a

intensidade do pico ao redor de $2\theta = 20-25^\circ$, embora o filme feito por *casting* apresente mais um pico de cristalinidade situado a $2\theta = 7^\circ$. Enquanto nos difratogramas onde a concentração de lecitina foi menor (23,86% de lecitina, Fig. A4.IV, B), observa-se a presença dos mesmos picos identificados na Fig. A4.IV, A, porém o difratograma do filme extrusado possui um pico de cristalinidade superior ao filme feito por *casting*.

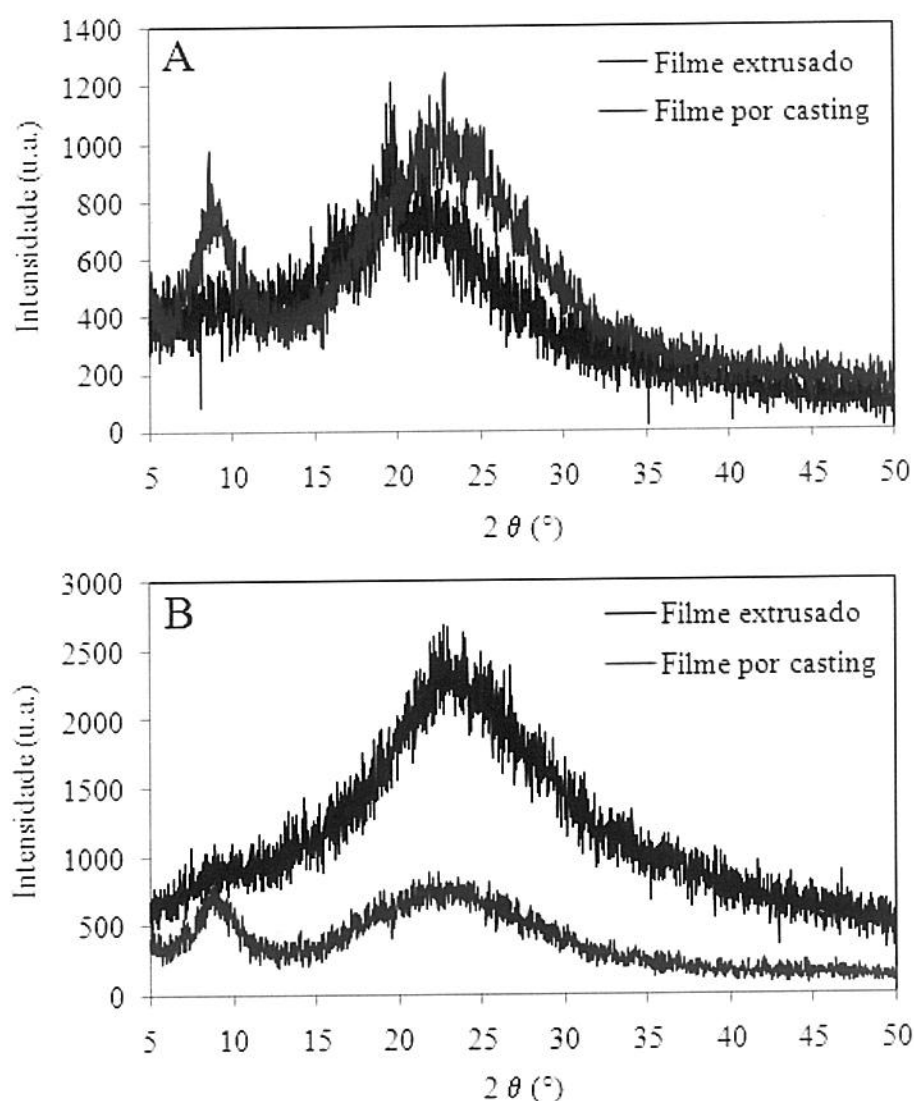


Fig. A4.IV. Difratogramas de raios-X para filmes a base de gelatina contendo lecitina processados por extrusão e feitos por *casting*. (A) 48% lecitina e 1% glicerol, (B) 23,86% lecitina e 3% glicerol.

Conclusões

Apesar das dificuldades encontradas no processamento dos filmes a base de gelatina contendo lecitina, foi possível obter formulações cujas concentrações de lecitina e glicerol associadas permitiram boas condições de processamento, resultando em filmes resistentes, flexíveis e altamente manuseáveis. São necessários mais estudos para adequação das condições de extrusão e o estudo de novas combinações de concentrações de plastificante e surfactante.

Agradecimentos

Tomás Galicia-García e Prof. Dr. Fernando Martínez-Bustos, CINVESTAV, Unidade Querétaro, México, pela participação e realização dos testes envolvendo a extrusão e caracterização dos filmes obtidos.

Referências Bibliográficas

- Derkach, S. R., Dyakina, T. A., & Levachev, S. M. (2005). Redistribution of water and gelatin between contacting liquid phases according to the IR spectroscopy data: the role of lecithin. *Colloid Journal*, 67, 547-553.
- Ha, T. T., & Padua, G. W. (2001). Effect of extrusion processing on properties of zein-fatty acids sheets. *Transactions of the ASAE*, 44, 1223-1228.

Anexo V. Obtenção de filmes a base de gelatina pela técnica de extrusão-sopro

FILMES POR SOPRO

Material e métodos

Material

Para a produção dos filmes soprados foram utilizados: gelatina suína tipo A (260 *bloom*) fornecida por Gelita México (Lerma, Estado do México); glicerol (CAS nº 56-81-5, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) e extrato natural de *Yucca schidigera* (yucca) fornecido por Agroin Baja Agroatnacional, lote UBA-028 (Baixa Califórnia, México).

Métodos

As análises de propriedades mecânicas, solubilidade, umidade, morfologia, temperatura de transição vítrea, espectroscopia de infravermelho e raios-X foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 6, item 2. Foi realizada também a análise qualitativa da curva de sorção de umidade usando-se um Dynamic Vapor Sorption Analyser DVS-1 (DVS Isotherm Analysis Report, SMS Surface Measurement Systems, Allentown, EUA) equipado com um microbalança Cahn D200. Os experimentos foram conduzidos a 25 ± 2 °C e umidade relativa variando de 50 a 95% e os resultados foram avaliados através do DVS Windows Versão 2.06.

Preparação dos pellets

Para a extrusão seguida de sopro foi escolhida a formulação que proporcionou o maior valor de alongamento para os filmes extrusados de gelatina e extrato de yucca. A mistura foi preparada conforme descrito no Capítulo 6, item 2.2.1., a partir da qual foram processados os *pellets* usando-se um extrusor monorosca (Cinvestav, Querétaro, México) com um canhão de 380 mm de comprimento e 19 mm de diâmetro, a uma taxa de compressão de 1:1. Foi utilizada uma matriz com múltiplos orifícios de 0,5 cm cada um. O canhão do extrusor foi equipado com termopares elétricos em três zonas independentes, sendo as temperaturas de alimentação, de cisalhamento e na saída da matriz, respectivamente, 30, 40 e 50 °C. Os *pellets* produzidos foram armazenados a 5 °C (65% RH) antes de serem processados pela extrusão a sopro.

Produção de filmes pela extrusão seguida de sopro

Um extrusor monorosca (Haake Model Rheomex 254, Germany) acoplado ao mecanismo de sopro foi utilizado na produção dos filmes tubulares, de acordo com as especificações técnicas:

- Diâmetro da rosca (D): 19 mm,
- Largura da rosca: 25 D,
- Matriz circular com diâmetro de 25 mm,
- Largura da abertura: 0-0,8 mm,
- Velocidade da rosca: 26 rpm,
- Raio inicial do filme: 40 mm,

- Espessura do filme: inicial de 0,5 mm e final de 0,18 mm,
- Velocidade dos rolos puxadores: 35 rpm
- Temperatura da matriz: 105 °C.

Obtenção dos filmes tubulares

O filme obtido por sopro (Fig. A1.V), a partir de pellets extrusados, apresentou uma superfície uniforme e sem rupturas. O processamento constante do filme tubular não foi possível devido a alta adesividade apresentada pela amostra, sendo que no momento em que os rolos puxadores agiam foi obtido uma só camada com espessura ao redor de 0,5 mm (Fig. A2.V). A diminuição da adesividade ao longo da coluna de resfriamento pode ser obtida controlando-se a velocidade do equipamento e o volume interno de ar, aumentando-se a relação das espessuras inicial e final do filme (Cantor, 2006).

A tonalidade observada é característica da amostra e não se observou presença problemas de atrito durante a formação da bolha. Os valores calculados no processo de extrusão-soprado foram relação de espessura de 2,7 indicando que houve uma diminuição de 2,7 vezes em relação a espessura inicial; relação de ar inflado de 6,25 e relação de estiramento de 0,65. O valor de relação de estiramento inferior ao valor de relação de ar inflado indica que a direcionalidade foi maior no sentido transversal ao fluxo, e o raio de formação de 0,10 também foi um indicador da baixa bidirecionalidade presente no filme.

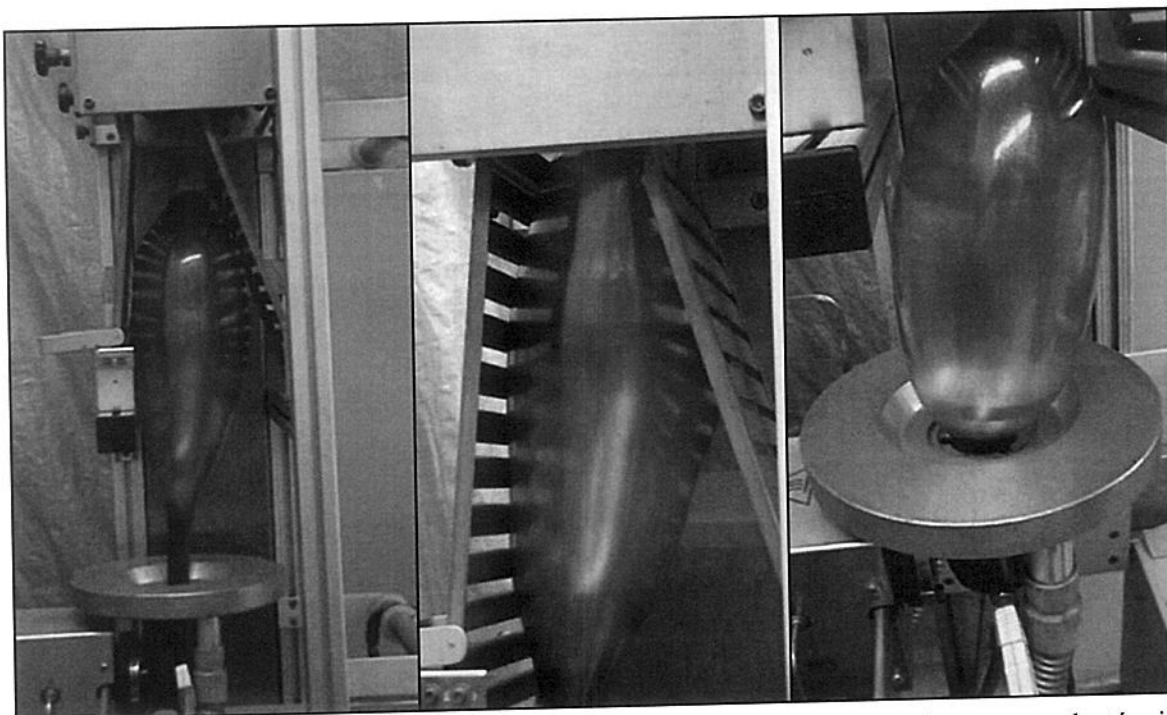


Fig. A1.V. Formação de filmes tubulares a base de gelatina e extrato de yucca pela técnica de sopro.

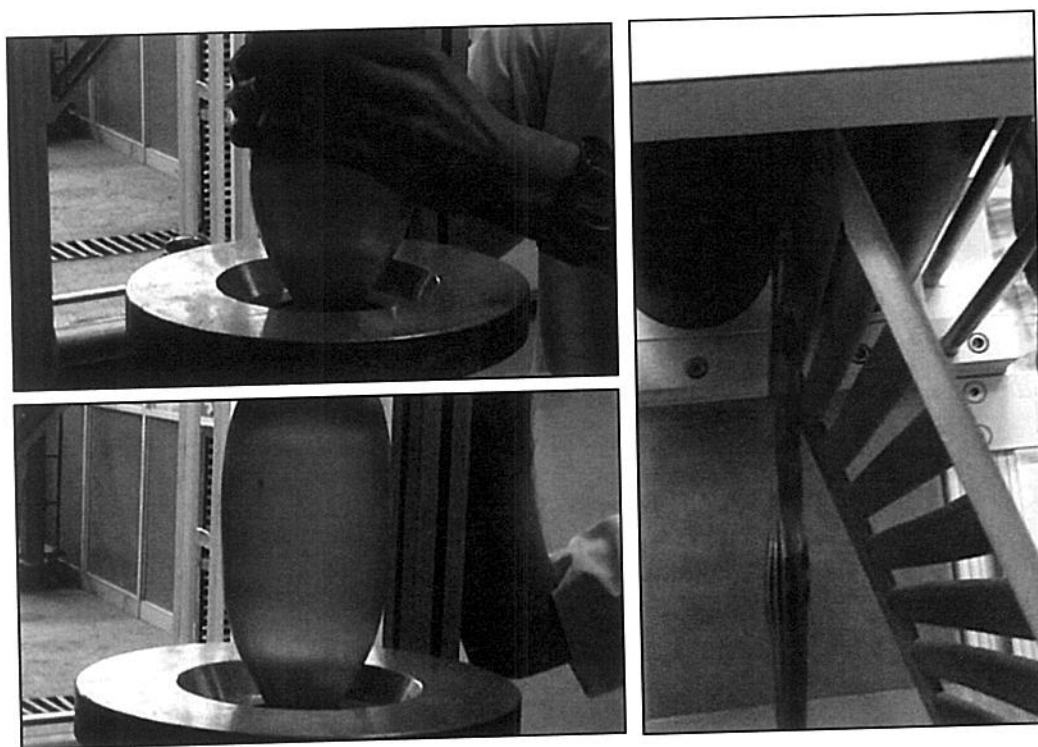


Fig. A2.V. Início da formação do filme soprado à esquerda e momento em que os rolos puxadores agem sobre o filme à direita.

Resultados preliminares

Os resultados obtidos e apresentados nessa seção foram realizados com base nas metodologias previamente descritas nos capítulos anteriores.

Propriedades mecânicas

A formulação que produziu o maior alongamento para o filme extrusado (48% de extrato de yucca e 8,75% de glicerol) foi suficientemente resistente e flexível para permitir a produção do filme soprado, embora esse filme tenha apresentado adesividade impedindo sua caracterização mecânica. Wang & Padua (2003) produziram filmes de zeína por extrusão e por extrusão e sopro e observaram diferenças significativas para os valores de alongamento entre os filmes obtidos. Para o filme produzido no extrusor monorosca a %A foi de 120,4% e para o filme soprado a %A foi de 91,1%, enquanto que para a tensão na ruptura não foi observada diferença significativa entre os dois métodos de produção, obtendo TS média de 3,2 MPa.

Solubilidade e teor de umidade

O valor de solubilidade obtido para o filme soprado (aproximadamente de 38%) não apresentou diferença significativa com relação a solubilidade observada para os filmes obtidos pela extrusão e por *casting* (Tabela A1.V).

Tabela A1.V. Comparação entre a solubilidade (Sol) e teor de umidade (Umi) de filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão, extrusão-sopro e por *casting*.

C_Y^I	C_G^I	Método	Sol (%)	Umi(%)
48	8,75	Extrusão	$39,8 \pm 1,6^a$	$15,1 \pm 1,2^a$
		Casting	$39,5 \pm 5,6^a$	$10,8 \pm 1,1^b$
		Extrusão-sopro	$37,9 \pm 1,6^a$	$15,2 \pm 0,4^a$

^IC_Y: Concentração de extrato de yucca (g 100 g⁻¹ de gelatina); C_G: Concentração de glicerol (g 100 g⁻¹ de gelatina), ^{a,b} Média ± Desvio padrão. Letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as medias obtidas através do teste de Tukey.

Curva de sorção de umidade

Pela análise da curva de sorção de umidade (Fig. A3.V) observa-se que o filmes soprado possui menor alteração em ganho de massa devido ao aumento nas condições de umidade relativa. No entanto, para esses dois casos a sorção de umidade ainda foi superior ao observado para os filmes obtido por *casting*, para filmes contendo extrato de yucca e filme simples de gelatina.

Morfologia

A morfologia (superfície e seção interna) dos filmes soprados foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura e pode ser observada na Fig. A4.V. Observa-se uma superfície com pouca irregularidade e uma seção transversal compacta e homogênea. O mesmo perfil de seção transversal pode ser observado nas imagens obtidas pelos filmes extrusados (Capítulo 6).

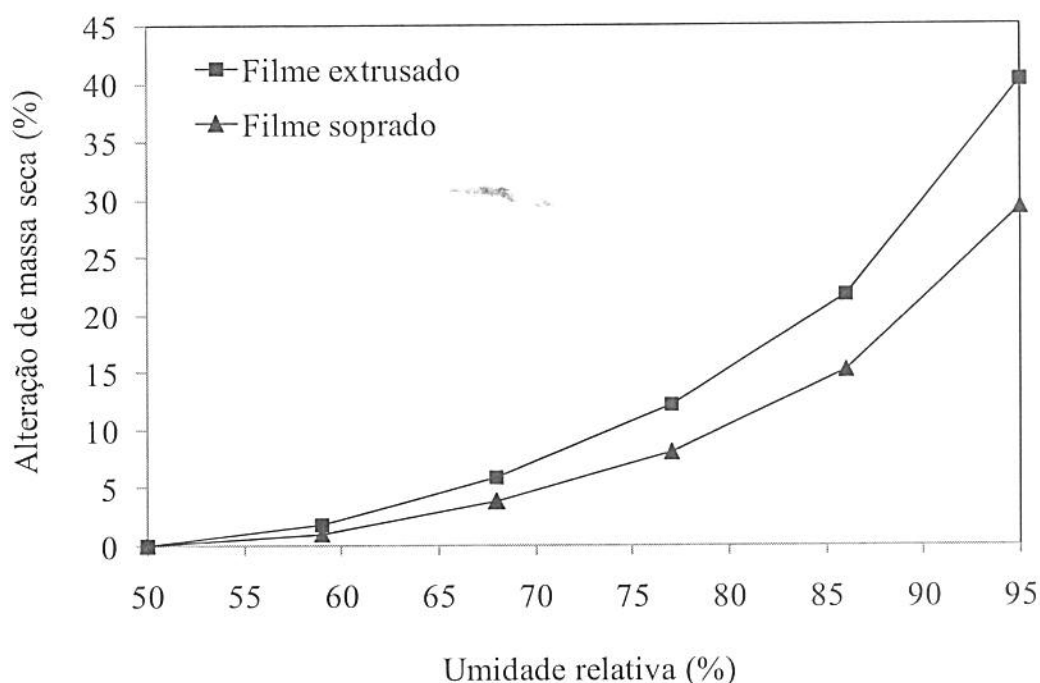


Fig. A3.V. Curva de sorção de umidade para filmes a base de gelatina e extrato de yucca processados por extrusão e extrusão-sopro.

Temperatura de transição vítrea (T_g)

Na análise calorimétrica observou-se a presença de duas T_g 's para o filme soprado, 73,9 °C e 87,7 °C. Da mesma forma foi observado para os filmes extrusados, com T_g 's a 70,0 °C e a 85,3 °C. Os valores próximos são decorrentes da mesma composição e da similaridade dos processos utilizados que favorecem a mobilidade estrutural do polímero o que pode ter determinado o abaixamento das temperaturas de transição vítrea em relação a T_g de 98,0 °C observada para o filme obtido por casting, para a mesma formulação.

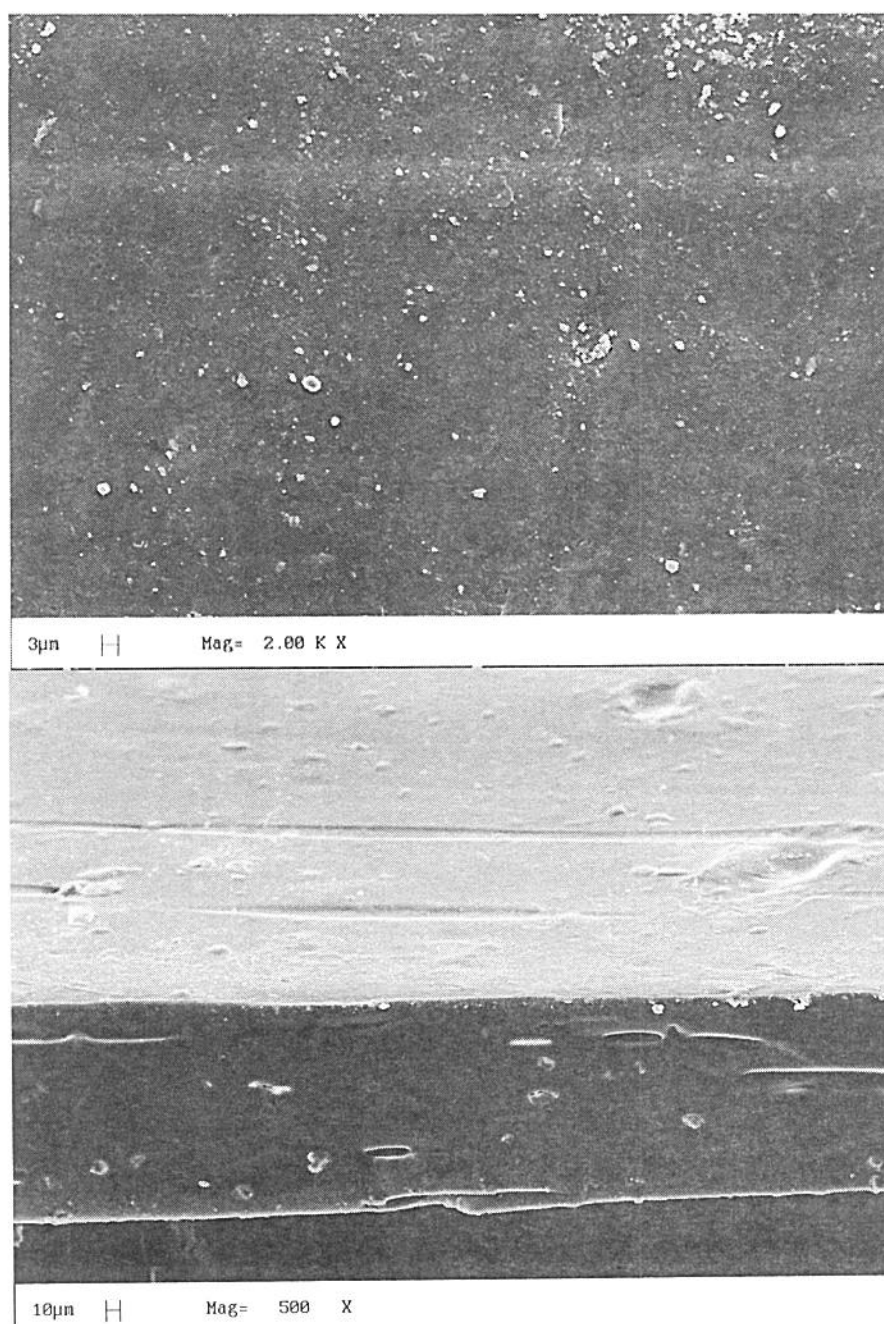


Fig. A4.V. Morfologias da superfície (imagem superior, barra = 3 µm) e seção transversal (imagem inferior, barra = 10 µm) de filmes soprados a base de gelatina e extrato de yucca.

Espectroscopia de infravermelho

O espectro obtido para o filme soprado (Fig. A5.V) observa-se uma relação estreita com o espectro obtido para o filme extrusado de mesma formulação. Ocorreu uma mudança na intensidade dos picos situados entre 2800 e 3000 cm^{-1} para a amostra de filme soprada, e essa alteração pode estar relacionada com a formação de ligações inter e intramoleculares entre os grupos OH do plastificante e a cadeia protéica.

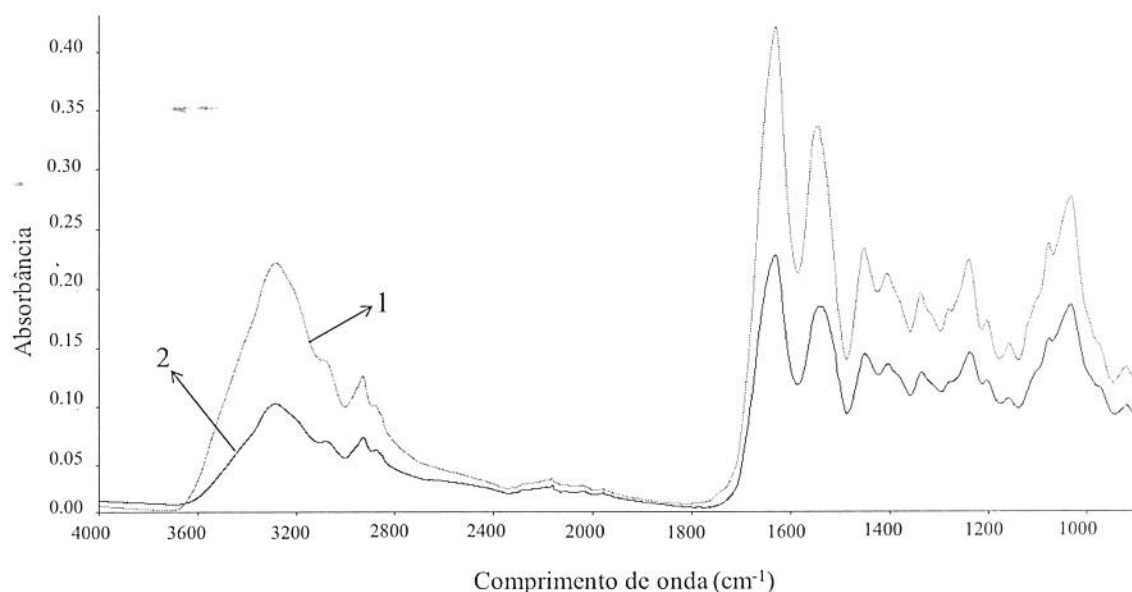


Fig. A5.V. Espectros de infravermelho para filmes a base de gelatina contendo extrato de yucca e glicerol produzidos por extrusão (1) e por extrusão-sopro (2).

Difração de raios-X

O difratograma obtido para o filme soprado pode ser observado na Fig. A6.V. O grau de cristalinidade foi calculado e o valor obtido para o filme soprado foi inferior ao observado para os filmes extrusados e feito por *casting* (Tabela A.2).

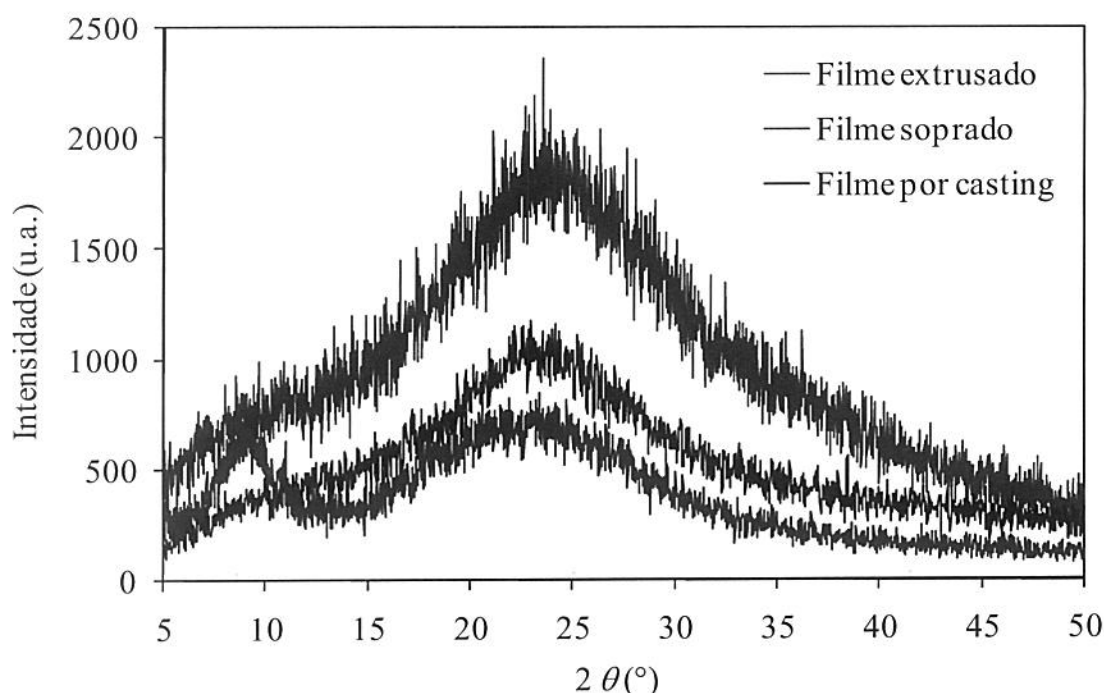


Fig. A6.V. Difratomogramas de raios-X para filmes a base de gelatina e extrato de yucca obtidos pelos métodos de extrusão e extrusão-sopro.

Tabela A2.V. Índice de cristalinidade relativa obtido para os filmes a base de gelatina, extrato de yucca e glicerol, produzidos por extrusão, extrusão-sopro e por *casting*.

C_Y^I	C_G^I	Índice de cristalinidade relativa (%)		
		Extrusão	Extrusão-sopro	Casting
48	8,75	$25,18 \pm 0,18^b$	$19,45 \pm 0,31^c$	$38,15 \pm 0,11^a$

¹ C_Y : Concentração de extrato de yucca ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de gelatina); C_G : Concentração de glicerol ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de gelatina), ^{a,b} Média $\pm$ Desvio, padrão. Letras diferentes representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as medias obtidas através do teste de Tukey.

Conclusões

A formulação que resultou em maior alongamento no filme extrusado foi suficientemente resistente e flexível para permitir o seu processamento pela técnica de extrusão seguida de sopro. O filme tubular obtido apresentou uma orientação preferencialmente no sentido transversal ao fluxo com baixas taxas de bidirecionalidade.

Agradecimentos

Rubén González-Nuñez (Departamento de Engenharia Química, Universidade de Guadalajara, Guadalajara, JI, México), Tomás Galicia-García e Prof. Dr. Fernando Martínez-Bustos (CINVESTAV, Unidade Querétaro, México), pela participação e realização dos testes envolvendo a extrusão-sopro e caracterização dos filmes obtidos.

Referências Bibliográficas

- Cantor, K. (2006). *Blown film extrusion*. Ed Kart Hanser Verlag, Munich, Germany.
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288, 886-893.